

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Böcker

Einfluss lysosomaler Cysteinproteasen auf proliferative Signalwege und Apoptosemechanismen in Prostatakarzinomzellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Susanne Dyckhoff

aus

Freising

Jahr

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstattein: Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler

Mitberichterstattein: Priv. Doz. Dr. Heike Pohla
Prof. Dr. Christian Ries

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicke

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2017

Meiner Familie und meinem Freund gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
A. Zusammenfassung	1
B. Einleitung	3
B.1. Prostatakarzinom.....	3
B.2. Proteasen und Tumoren	4
B.3. Cathepsine	5
B.3.1. Cathepsin X	6
B.3.2. Cathepsin B	7
B.3.3. Cathepsin L.....	8
B.3.4. Cathepsin K	9
B.4. Zelluläre Seneszenz	9
B.5. Apoptose	11
B.6. IGF System und Signalweg	14
B.7. Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	17
C. Material und Methoden	18
C.1. Material	18
C.1.1. Geräte.....	18
C.1.2. Bioinformatik	19
C.1.3. Zelllinien	19
C.1.4. Chemikalien und Materialien	19
C.1.4.1. Zellbiologie	19
C.1.4.2. Oligonukleotide.....	20
C.1.4.3. Molekularbiologie	21
C.1.4.4. Proteinchemie	21
C.1.4.5. Antikörper und Konjugate	22
C.2. Methoden	24
C.2.1. Zellbiologische Methoden	24
C.2.1.1. Zellkultur.....	24
C.2.1.2. Zellzählung.....	24
C.2.1.3. Stimulation der Zellen mit IGF-I und IGF-II	24
C.2.1.4. siRNA-Transfektion von Prostatakarzinomzellen	25
C.2.1.5. Behandlung der Prostatakarzinomzellen mit Cysteinproteaseinhibitoren	25
C.2.1.6. Annexin V-Färbung zur Apoptosemessung	26

C.2.1.7. TUNEL Assay	26
C.2.1.8. BrdU ELISA	27
C.2.1.9. CyQuant Assay	27
C.2.2. Molekularbiologische Methoden	28
C.2.2.1. RNA-Isolierung aus Prostatakarzinomzellen	28
C.2.2.2. cDNA-Synthese	28
C.2.2.3. Quantitative PCR	29
C.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	29
C.2.3. Proteinchemische Methoden	29
C.2.3.1. Proteinextraktion aus Prostatakarzinomzellen	29
C.2.3.2. Isolation des Zellkulturüberstands	30
C.2.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung	30
C.2.3.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	31
C.2.3.5. Immunoblot	31
C.2.3.6. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	33
C.2.3.7. Quantitative Bestimmung von Cathepsin B mittels ELISA	33
C.2.3.8. Quantitative Bestimmung von Cathepsin L mittels ELISA	33
C.2.3.9. Immunfluoreszenzfärbung	34
C.2.3.10. Messung der Apoptose mithilfe der Caspase 3-Aktivität	34
C.2.3.11. Cathepsin-Aktivitätsmessung	35
C.2.4. Statistische Auswertung	35
D. Ergebnisse	37
D.1. siRNA-vermittelte Downregulation von Cathepsinen in Prostatakrebszellen	37
D.1.1. Proliferation der Prostatakarzinomzellen	40
D.1.2. Zelluläre Seneszenz der Prostatakarzinomzellen	41
D.1.3. Apoptose in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen	42
D.1.3.1. Expression der Apoptoseproteine Bax, Bid und Bcl-2	42
D.1.3.2. Annexin V-Färbung zur Apoptosemessung	45
D.1.3.3. TUNEL-Assay	47
D.1.3.4. Messung der Apoptose über die Caspase 3-Aktivität	48
D.1.4. Untersuchung des IGF-Signalwegs	50
D.2. Inhibition der proteolytischen Aktivität mit Cysteinproteaseinhibitoren in Prostatakarzinomzellen	53
D.2.1. Proliferation der Prostatakarzinomzellen	54
D.2.2. Apoptose der PC3- und LNCaP-Zellen	56
D.2.2.1. Expression der Apoptoseproteine Bid, Bax und Bcl-xL	56
D.2.2.2. Annexin V-Färbung zur Apoptosemessung	57

D.2.2.3. TUNEL-Assay.....	59
D.2.2.4. Messung der Apoptose über die Caspase 3-Aktivität.....	60
D.2.3. Untersuchung des IGF-Signalwegs.....	60
E. Diskussion.....	62
E.1. Beteiligung von Cathepsinen an Prozessen der Tumorprogression	62
E.2. Suppression von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen.....	63
E.3. Rolle der Cathepsine bei der Proliferation von Tumorzellen	65
E.4. Auswirkung der Cathepsindefizienz auf Tumorsuppressormechanismen	69
E.4.1. Zelluläre Seneszenz.....	69
E.4.2. Apoptose.....	70
E.5. Einfluss der Cathepsin-Defizienz auf den IGF-Signalweg	75
F. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	80
G. Literaturverzeichnis.....	81
H. Danksagung	93
I. Eidesstattliche Versicherung	94

Abkürzungsverzeichnis

Ac-DEVD-AFC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC
AF	Alexa Fluor
AFC	7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin
AU	Arbitrary Units
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovine serum albumin
CA-074	(L-3-trans-(Propylcarbamyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline
CA-074-Me	(L-3-trans-(Propylcarbamyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline methyl ester
Cat	Cathepsin
cDNA	Complementary DNA
CTSB	Cathepsin B
CTSK	Cathepsin K
CTSL	Cathepsin L
CTSZ	Cathepsin X
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-64	Trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane
E-64d	(2S,3S)-trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HRP	Horse radish peroxidase
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-IR	Insulin-like growth factor I- receptor

MAPK	Mitogen associated protein kinase
MMP	Matrix-Metallo-Proteasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Real time- polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris buffered saline mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	Unit
Z-VAD-FMK	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon

A. Zusammenfassung

Prostatakrebs ist mit einer Zahl von etwa 63.700 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste Krebsart bei Männern in Deutschland (Robert-Koch-Institut (RKI), 2012). Obwohl es dank zahlreicher Forschungen ein breites Spektrum an Therapieoptionen gibt, ist dieser Tumor mit etwa 13.000 Sterbefällen pro Jahr die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland (RKI, 2012). Deshalb ist es von großer Bedeutung, weiterhin auf diesem Gebiet zu forschen und neue Zusammenhänge und Therapieoptionen zu entdecken.

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Proteasen wichtige Funktionen für Tumoren ausüben. Hauptsächlich verleihen sie den Tumorzellen durch Abbau der extrazellulären Matrix die Möglichkeit zur Invasion und Metastasierung. Doch in den letzten Jahren kristallisierten sich noch viele weitere Funktionen heraus, durch die Proteasen die Tumorprogression fördern.

Cathepsine sind eine Gruppe von Cysteinproteasen, die physiologischerweise in den Lysosomen der Zellen vorkommen und dort hauptsächlich Proteine abbauen. In zahlreichen Tumoren werden Cathepsine überexprimiert, z.B. in Magenkrebs, Brustkrebs, Hirntumoren und Prostatakrebs. In Prostatakarzinomen sind vor allem die Cathepsine X, B, L und K im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe stark überexprimiert. Ihre genauen Funktionen sind jedoch noch nicht komplett geklärt. Die Downregulation von Cathepsin X führte in Prostatakarzinomzellen zu verringerter Invasionsfähigkeit, doch die Cathepsine scheinen noch weitere wichtige Funktionen für die Tumorfortschreitung zu übernehmen, die in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollten.

Die Proliferation der Prostatakarzinomzellen wurde durch die siRNA-vermittelte Downregulation der Cathepsine X, B, L oder K nicht beeinträchtigt. Bei Behandlung mit dem zellgängigen Cysteinproteaseinhibitor CA-074-Me, der spezifisch Cathepsin B hemmt, war die Proliferationsrate jedoch nach 4 Tagen um ca. 60-80 % signifikant reduziert.

In vorherigen Experimenten mit Fibroblasten, in denen Cathepsin X durch RNA-Interferenz herabreguliert worden war, fiel ein seneszenten Phänotyp der Zellen auf. Die Fibroblasten waren in ihrer Morphologie vergrößert und abgeflacht, traten aus dem Zellzyklus aus und exprimierten typische Seneszenzmarker wie Beta-Galaktosidase. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass in Prostatakrebszellen durch Downregulation von Cathepsin X oder auch den Cathepsinen B, L und K der gleiche Effekt hervorgerufen werden könnte, durch den die Tumorzellen in Seneszenz übergehen würden. Doch in beiden getesteten

Prostatakarzinomzelllinien führte die Defizienz der Cathepsine X, B, L oder K nicht zu einem seneszenten Phänotyp. Sie wuchsen normal weiter, wiesen keine morphologischen Veränderungen auf und zeigten keinen Anstieg von Seneszenzmarkern. Stattdessen fiel bei den Cathepsin-defizienten Prostatakrebszellen in verschiedenen Apoptoseexperimenten eine erhöhte Tendenz zur Apoptoseinduktion auf. Zudem zeigten sich einige Apoptoseproteine der Bcl-2-Familie in ihrer Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene verändert. Auch bei Behandlung der Prostatakarzinomzellen mit Cysteinproteaseinhibitoren zur Hemmung der Cathepsine auf Proteinebene war eine erhöhte Apoptoserate feststellbar.

Der Signalweg, über den der Knockdown bzw. die Hemmung der Cathepsine zu einer verstärkten Apoptose in Prostatakarzinomzellen führen könnte, ist noch nicht komplett geklärt, aber es finden sich Hinweise, dass der IGF (Insulin-like Growth Factor)-Signalweg beteiligt sein könnte, der in sehr vielen Tumoren eine wichtige Rolle für das Wachstum spielt. Die Aktivierung des IGF-I-Rezeptors induziert über die Downstream-Moleküle Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) erhöhte Zellproliferation und verminderte Apoptose der Zelle. In den Prostatakarzinomzellen mit siRNA-vermittelter Downregulation von Cathepsinen war der IGF-I-Rezeptor verstärkt exprimiert und die Aktivierung des Rezeptors leicht reduziert.

Die meisten bisherigen Krebsmedikamente zielen in ihrer Wirkung auf die Auslösung von Apoptose in den Tumorzellen ab, doch häufig entwickeln die Krebszellen durch verschiedene Mechanismen Resistenzen gegen die Apoptoseinduktion. Die Erkenntnisse dieser Arbeit und weitere Untersuchungen der molekularen Grundlagen sollen langfristig die Bewertung der Cathepsine als Zielparameter zur Bekämpfung der Therapieresistenz fortgeschrittener Prostatakarzinome ermöglichen.

B. Einleitung

B.1. Prostatakarzinom

Prostatakrebs ist die führende Krebsart unter europäischen und amerikanischen Männern und die zweithäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen (Marech et al., 2012). Es handelt sich dabei histologisch um ein Adenokarzinom, eine maligne Neoplasie, ausgehend von den Basalzellen der Prostataadrüsengänge. Die prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN), bei der die Prostataepithelzellen bereits neoplastische Zellkernatypien aufweisen, jedoch die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben, ist die Vorstufe des Prostatakarzinoms (Algaba et al., 2007). Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung von Prostatakrebs sind beispielsweise ein erhöhter Wert des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Blut (Kirby, 2016), erhöhter Testosteron-Spiegel, positive Familienanamnese und Adipositas (Podgorski et al., 2007).

In den Anfangsstadien verläuft das Prostatakarzinom meist symptomlos; später treten gelegentlich Miktionsstörungen, Nykturie oder Restharnbildung auf, wenn der lokale Tumor so stark gewachsen ist, dass er auf die Harnröhre drückt, die durch die Prostata verläuft. In weiter fortgeschrittenen Erkrankungsstadien kann der Krebs in umgebende Gewebe und Organe infiltrieren oder Fernmetastasen bilden, die besonders häufig in Knochen lokalisiert sind (Weidle et al., 2016). Bei Patienten mit Knochenmetastasen treten häufig Symptome wie pathologische Frakturen und Rückenschmerzen auf.

Bei den meisten Erkrankten ist das Prostatakarzinom auf den lokalen Befund beschränkt und kann sehr gut mit chirurgischen Maßnahmen und Strahlentherapie behandelt und häufig geheilt werden. Dennoch leiden ca. 10-20% der Patienten an fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Erkrankungen, welche mit chirurgischen Methoden und Strahlentherapie alleine nicht mehr behandelt werden können. Prostatakarzinome metastasieren bevorzugt in die Knochen, v.a. in das axiale Skelett und die langen Metaphysen (Podgorski et al., 2007). In diesen Fällen werden LHRH-Agonisten (Luteinisierungs-Hormon-Releasing-Hormon) oder Antiandrogene verabreicht, welche die Androgene – die wichtigsten Wachstumsfaktoren von Prostatakrebszellen – supprimieren sollen. Doch auch gegen diese Medikamente entwickeln die meisten Patienten nach 1 bis 2 Jahren eine Therapieresistenz. Man spricht dabei von CRPC, dem Kastrations-resistenten Prostatakrebs, gegen den bisher nur sehr begrenzte Therapiemöglichkeiten existieren (Marech et al., 2012; Wadosky and Koochekpour, 2016). Daher ist es von großer Bedeutung, neue Therapiemöglichkeiten gegen CRPC zu erforschen, um den betroffenen Patienten besser helfen zu können.

B.2. Proteasen und Tumoren

Die gefährlichste Eigenschaft von Krebszellen ist ihre Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung (Diepenbruck and Christofori, 2016). Erst diese macht aus einem benignen Tumor eine maligne Neoplasie. Wenn ein Tumor lokal begrenzt ist, ist er meist sehr gut chirurgisch resezierbar; doch sobald der Tumor die Organgrenzen überschreitet, in benachbarte Organe infiltriert oder über den Blutstrom in weit entfernte Regionen gelangt und dort weiterwächst, ist er häufig nur noch schwer zu behandeln.

Voraussetzungen für Invasion und Metastasierung sind die Ablösung der Zellen aus ihrem ursprünglichen Gewebenetzwerk, der Durchbruch der Basalmembran, welche das Epithel von dem umgebenden Stromagewebe trennt, in dem sich die Lymph- und Blutgefäße befinden, und die Fähigkeit, in Stromaumgebung zu wachsen. Damit sich die Tumorzellen vom Zellverband ablösen können, exprimieren sie beispielsweise reduziert E-Cadherin, ein Protein für den Ausbau von Zell-Zell-Kontakten, und verstärkt N-Cadherin (Algaba et al., 2007). Für die Fähigkeit der malignen Zellen, die Basalmembran zu durchbrechen, benötigen diese die Aktivität einer Vielzahl von Proteasen, welche die wichtigen Bestandteile wie Kollagen IV und Laminin abbauen können (Palermo and Joyce, 2008; Pittayapruet et al., 2016). Diese Befähigung zu Invasion und Metastasierung der Krebszellen macht Proteasen zu bedeutenden Faktoren der Tumorprogression, was sich auch anhand ihrer Überexpression in zahlreichen Tumoren zeigt. Im Laufe der Zeit haben sich zudem noch weitere Funktionen der Proteasen in Tumoren herausgestellt. So begünstigen sie beispielsweise das Tumorwachstum und die Angiogenese – die Neubildung von Blutgefäßen –, durch die der wachsende Tumor besser versorgt werden kann (Edwards and Murphy, 1998); außerdem sind Proteasen an der Aktivierung von Signalwegen beteiligt (Palermo and Joyce, 2008).

Da bereits in den 1990er Jahren herausgefunden wurde, dass Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) eine wichtige Rolle in Tumoren spielen, wurden damals MMP-Inhibitoren hergestellt und klinisch für die Behandlung von Tumoren getestet. In der Phase 3 der klinischen Tests versagten die MMP-Inhibitoren jedoch sehr überraschend, indem sich keine positiven Effekte in der Therapie zeigten. Im Nachhinein wurden die damaligen Fehler gründlich analysiert und es zeigte sich, dass die verwendeten MMP-Inhibitoren alle MMP breit hemmten, ohne zwischen pro- oder anti-tumorigenen Proteasen zu unterscheiden. Außerdem wurden die MMP-Inhibitoren nur bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung getestet, obwohl die Forscher herausfanden, dass MMP vor allem eine wichtige Rolle in der Entstehung des Tumors spielen. Zudem waren Dosisreduktionen wegen starker muskuloskelettaler Nebenwirkungen der MMP-Inhibitoren nötig, wodurch die

Ergebnisse möglicherweise verzerrt wurden. Und zuletzt wurden die Patienten nicht auf eine Überexpression von MMP getestet, bevor sie die MMP-Inhibitoren verabreicht bekamen (Palermo and Joyce, 2008).

Daraus kann man schließen, dass Proteasen zwar für die Tumorentwicklung und Fortschreitung von essenzieller Bedeutung sind und deshalb gute Ziele für neue Krebsmedikamente darstellen, jedoch zunächst eine intensive Erforschung der genauen Wirkungen und Mechanismen von überexprimierten Proteasen notwendig ist, bevor man mit der Produktion und Testung von effektiven Hemmstoffen beginnen kann (Mohamed and Sloane, 2006).

B.3. Cathepsine

Eine bedeutende Gruppe unter den Proteasen bilden die Cathepsine, welche in dieser Arbeit erforscht wurden und deshalb an dieser Stelle genauer behandelt werden. Im menschlichen Genom sind mehr als 550 Proteasen und über 200 endogene Proteaseinhibitoren kodiert (Reiser et al., 2010). Darunter sind Cathepsine eine Gruppe von Proteasen, deren Name von dem griechischen Wort kathépsein – verdauen – abstammt. Sie gehören zu der Papain-Familie, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Papain, der Hauptprotease der Papaya-Pflanze, die hauptsächlich in Latex vorkommt. Die Cathepsine lassen sich nach der Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms in Serinproteasen (Cathepsine A und G), Aspartatproteasen (Cathepsine D und E) und Cysteinproteasen (Cathepsine B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X) unterteilen (Reiser et al., 2010; Siklos et al., 2015).

Cathepsine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum als inaktive Proenzyme synthetisiert und im Anschluss durch den Golgi-Apparat transportiert, wo sie einen Mannose-6-Phosphat-Rest angehängt bekommen und als Komplex mit dem kleinen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor zu den Lysosomen transportiert werden. Im sauren Milieu des Lysosoms wird die Proregion der Cathepsine durch andere Cathepsine abgespalten, wodurch sie aktiviert werden. Das Lysosom ist der Hauptwirkungsort von Cathepsinen, dort werden verschiedene Proteine und Peptide aus dem Zellinneren oder aus dem Extrazellularraum abgebaut. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Cathepsin-Vorstufen aus dem Golgi-Apparat in den Extrazellularraum sezerniert werden. Dieser Schritt ist besonders bei Tumorzellen von Bedeutung, zumal in der Tumorumgebung häufig ein saurer pH herrscht, in welchem die Cathepsine leichter aktiviert werden können (Palermo and Joyce, 2008). Um wieder in die Zelle aufgenommen zu werden, binden die Cathepsine mit ihrem Mannose-6-Phosphat-Rest extrazellulär an den großen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor an der Plasmamembran und werden daraufhin wieder internalisiert und zu

den Lysosomen transportiert. 5% der im rauen ER synthetisierten Cathepsine werden ohne den Umweg über den Golgi-Apparat gleich als Proenzym von den Zellen freigesetzt. Durch Exonskipping oder alternatives Splicen können zudem einige Cathepsine in den Zellkern oder in Mitochondrien gelangen (Reiser et al., 2010).

Die physiologischen Funktionen der Cathepsine sind sehr vielseitig und bestehen unter anderem in der Mitwirkung bei der Antigenpräsentation in der Immunabwehr, dem Kollagenstoffwechsel durch den Abbau von Kollagen und der Prozessierung von Hormonen. Da Cathepsine eine wichtige Rolle bei vielen Prozessen im Organismus spielen, sind sie auch an vielen unterschiedlichen Krankheitsbildern beteiligt, wie beispielsweise Pankreatitis, Arteriosklerose, Lungenerkrankungen, Immundefekten, Arthritis und Tumorerkrankungen (Reiser et al., 2010). In den letzten Jahren wurde zudem die Rolle von Cathepsinen in der Alzheimer-Demenz erforscht (Hasanbasic et al., 2016).

Die in vielen Tumoren hochregulierten Cathepsine üben für die Krebsfortschreitung sehr wichtige pathologische Funktionen aus: zum einen den Abbau von Kollagen, Fibronectin und Laminin sowie weiteren Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wodurch den Tumorzellen die Invasion und Metastasierung erleichtert wird. Außerdem aktivieren sie andere Proteasen, wie z.B. MMPs und uPA (Nalla et al., 2010), die ihrerseits ebenso die Invasionsfähigkeit des Tumors begünstigen. Des Weiteren sind Cathepsine an der Angiogenese und dem Tumorwachstum beteiligt (Edwards and Murphy, 1998). In der letzten Zeit zeigte sich jedoch noch eine weitere wichtige Funktion dieser Enzyme – die Beteiligung an Signaltransduktionswegen in Tumorzellen (Kraus et al., 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit behandelten Cathepsine sind die lysosomalen Cysteinproteasen Cathepsin X, B, L und K, weshalb diese hier näher charakterisiert werden.

B.3.1. Cathepsin X

Cathepsin X zeigt sich stark überexprimiert in Magen- und Prostatakrebs und dessen Vorstufe, der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) (Abb. B.1) (Nagler et al., 2004). Auch im hepatozellulären Karzinom und malignen Melanom ist die Expression von Cathepsin X stärker als in normalem Gewebe (Kos et al., 2014). Cathepsin X verfügt als Carboxypeptidase, welche eine Aminosäure von C-Terminus eines Proteins abspalten kann, lediglich über Exopeptidaseaktivität. Dadurch, dass der Proteinabbau durch Cathepsin X deshalb nur sehr langsam verläuft und nicht sehr

effektiv ist, wird davon ausgegangen, dass Cathepsin X nicht am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt ist, sondern andere für die Tumorfortschreitung bedeutende Funktionen in Tumoren ausübt (Mohamed and Sloane, 2006). Im Vergleich zu anderen Cathepsinen besitzt Cathepsin X nur eine kurze Proregion, die in der Lage ist, durch eine Disulfidbrücke kovalent an das Cystein im aktiven Zentrum zu binden und so das Enzym zu autoinhibieren. Eine drei Aminosäuren lange Insertion in einer stark konservierten Region in der Nähe des aktiven Zentrums ist verantwortlich für die ungewöhnliche Carboxypeptidaseaktivität unter den Cathepsinen (Sivaraman et al., 2000). Einzigartig unter den Cathepsinen ist Procathepsin X auch durch die Expression eines RGD-Motivs im Propeptid des Enzyms, welches an das Integrin $\alpha\beta3$ binden kann. Integrine sind Adhäsionsrezeptoren an der Zelloberfläche und Integrin $\alpha v\beta3$, welches beispielsweise in Prostatakrebs exprimiert ist, ist bekanntermaßen beteiligt an Tumor-induzierter Angiogenese und spielt zudem eine kritische Rolle bei Tumorwachstum und Metastasierung. So war nach Knockdown von Cathepsin X in humanen Endothelzellen (HUVEC) die Migrationsfähigkeit der Zellen reduziert (Lechner et al., 2006).

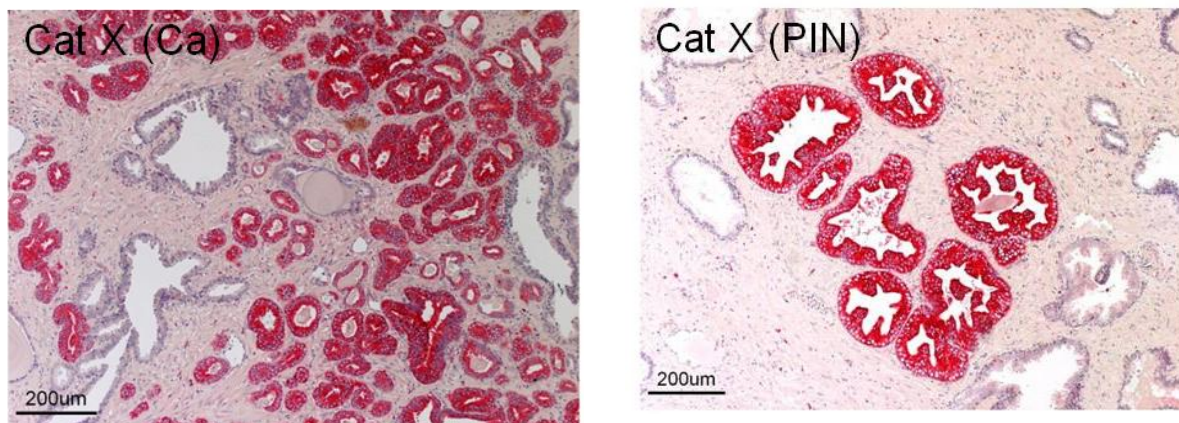


Abb. B.1: Hochregulation von Cathepsin X in Prostatakarzinom (Ca) und prostatic intraepithelial Neoplasie (PIN). (Nagler et al., 2004)

B.3.2. Cathepsin B

Cathepsin B ist überexprimiert in Tumoren des Magen-Darm-Trakts, Prostata- und Brustkrebs, Gliomen und Melanomen (Mohamed and Sloane, 2006). Die Cysteinprotease hat viele onkogene Funktionen, wie den Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) oder die Aktivierung von uPA, Plasminogen und Matrix-Metallo-Proteasen (MMP). Cathepsin B baut zudem die MMP-Inhibitoren TIMP 1&2 ab, was wiederum zu verstärktem ECM-Abbau durch MMP und zu Angiogenese führt.

Cathepsin B wird durch Cathepsin D, Tissue Plasminogen Aktivator (tPA) und Urokinase-like Plasminogen Aktivaor (uPA) aktiviert und besitzt auch die Fähigkeit zur Autoaktivierung (Gondi and Rao, 2013). Cathepsin verfügt über Exo- und Endopeptidaseaktivität, spaltet Proteine folglich an deren Ende oder in der Mitte. Dies geschieht durch die Präsenz einer „occluding loop“, die bei saurem pH das aktive Zentrum partiell blockiert und dadurch Cathepsin B zu einer Carboxydipeptidase macht, während bei neutralem pH das aktive Zentrum frei für größere Substrate ist und deshalb Cathepsin B Endopeptidaseaktivität besitzt. An der sauren Tumorzelloberfläche agiert Cathepsin B folglich als Carboxypeptidase, ähnlich wie Cathepsin X (Aggarwal and Sloane, 2014). Eine Studie fand außerdem Hinweise darauf, dass Cathepsin B zudem über nicht-proteolytische Funktionalität verfügt (Sigloch et al., 2016).

B.3.3. Cathepsin L

Die Expression von Cathepsin L, welches physiologischerweise in den meisten Geweben vorkommt, ist in vielen Tumoren verändert, besonders in primären Knochentumoren wie Osteosarkomen, Riesenzelltumoren, multiplem Myelom und Chondrosarkomen und zudem in Tumoren, die bevorzugt in Knochen metastasieren, wie Brust-, Prostata- Lungen-, Larynxkrebs und Melanomen (Sudhan and Siemann, 2015). Cathepsin L ist eine Endopeptidase (Mohamed and Sloane, 2006), besteht aus einer schweren Kette (21 kDa) und einer leichten Kette (5 kDa) und besitzt eine zu 80% identische Proteinsequenz wie Cathepsin L2 bzw. Cathpsin V, übernimmt jedoch andere Funktionen. Die Hauptfunktion von Cathepsin L ist der Abbau von intrazellulären und sezernierten regulatorischen Proteinen im Lysosom. Es spielt jedoch zusätzlich bei sehr vielen weiteren Prozessen eine Rolle, wie Apoptose, Gewebshomöostase, Immunantwort, Aktivierung von anderen proteolytischen Enzymen, Hormonproduktion und –prozessierung, Abbau von nukleären Transkriptionsfaktoren und Recyclingprozessen bei Axonwachstum und Synapsenbildung. Cathepsin L kann viele für Tumorprogression wichtige Funktionen ausüben. Durch den Abbau von extrazellulärer Matrix, Aktivierung von MMPs und der Serinprotease uPA und durch den Abbau des Zell-Zell-Adhäsionsproteins E-Cadherin fördert Cathepsin L die Invasions- und Metastasierungsfähigkeiten von Tumorzellen, besonders in Knochen, da das Enzym zudem am Abbau der Knochenmatrix beteiligt ist (Leto et al., 2010). Außerdem spielt die Protease eine Rolle bei der Angiogenese, zum einen durch Interaktionen mit VEGF, einem Wachstumsfaktor für Gefäße, und durch Bildung und Abbau von Endostatin, einem Angiogenese inhibierenden Protein (Lankelma et al., 2010).

B.3.4. Cathepsin K

Cathepsin K ist pathologisch in Sarkomen, Prostata-, Lungen- und Brustkrebs überexprimiert, welche bevorzugt in Knochen metastasieren (Verbovsek et al., 2015). Cathepsin K ist ebenfalls eine Endopeptidase, die besonders auf den Abbau von Kollagen I, welches im Knochen vorkommt, spezialisiert ist. Sie ist deshalb physiologisch stark in Osteoklasten exprimiert. Neben Kollagen kann Cathepsin K zudem Gelatin, Elastin, Aggrecan und Osteonectin hydrolysieren. Zusätzlich zu dem Abbau extrazellulärer Matrix ist Cathepsin K an Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt (Verbovsek et al., 2015). Vor einigen Jahren wurde bereits ein selektiver Cathepsin K-Inhibitor – Odanacatib – entwickelt, der zur Behandlung von postmenopausaler Osteoporose und von Knochenmetastasen aus Brust- oder Prostatatumoren eingesetzt werden soll. Der Inhibitor, der die Knochenresorption hemmen soll, befindet sich derzeit in klinischer Testung (Anderson et al., 2014; Papachristou et al., 2012).

B.4. Zelluläre Seneszenz

Zelluläre Seneszenz ist ein Tumorsuppressormechanismus, der erst seit recht kurzer Zeit bekannt ist. Er wird durch zellulären Stress, wie onkogene Stimulation, Telomerverlust, oxidativen Stress oder DNA-Schäden aktiviert und verhindert, dass die Zellen entarten und die Tumorentwicklung begünstigt wird. Das Einsetzen der Seneszenz löst einen Zellzyklusarrest und damit das Einhalten der Proliferation aus, wodurch eine Tumorentstehung verhindert oder zumindest verzögert werden kann. Zellen, die in Seneszenz übergegangen sind, weisen einige charakteristische Eigenschaften auf. Zunächst sind sie aus dem normalen Zellzyklus ausgetreten und dieser Austritt ist in der Regel irreversibel. Dazu treten einige morphologische Veränderungen auf: die Zellen werden größer, flachen vermehrt ab und sind stärker granuliert. Zudem gibt es mehrere Biomarker, die in seneszenten Zellen hochreguliert sind, wie Beta-Galaktosidase, p16INK4a, p21CIP1, p15INK4b oder p27Kip1 (Lujambio, 2016; Saab, 2011).

Dennoch entwickeln sich aus prämaligen Zellformationen häufig maligne Tumoren, obwohl es zelluläre Seneszenz als Tumorsuppressormechanismus gibt. Deshalb muss es eine Möglichkeit geben, wie Tumorzellen der Seneszenz entgehen können. Dazu gibt es im Moment zwei Theorien, die diskutiert werden: entweder umgeht eine Gruppe von Tumorzellen die zelluläre Seneszenz primär bei der Tumorentwicklung (Abb. B.2) oder alle Tumorzellen gehen zuerst in Seneszenz über und eine Gruppe der Zellen schafft es durch einen unbekannten Mechanismus, wieder in den

Zellzyklus einzutreten und so dem Mechanismus der zellulären Seneszenz zu entfliehen (Saab, 2011).

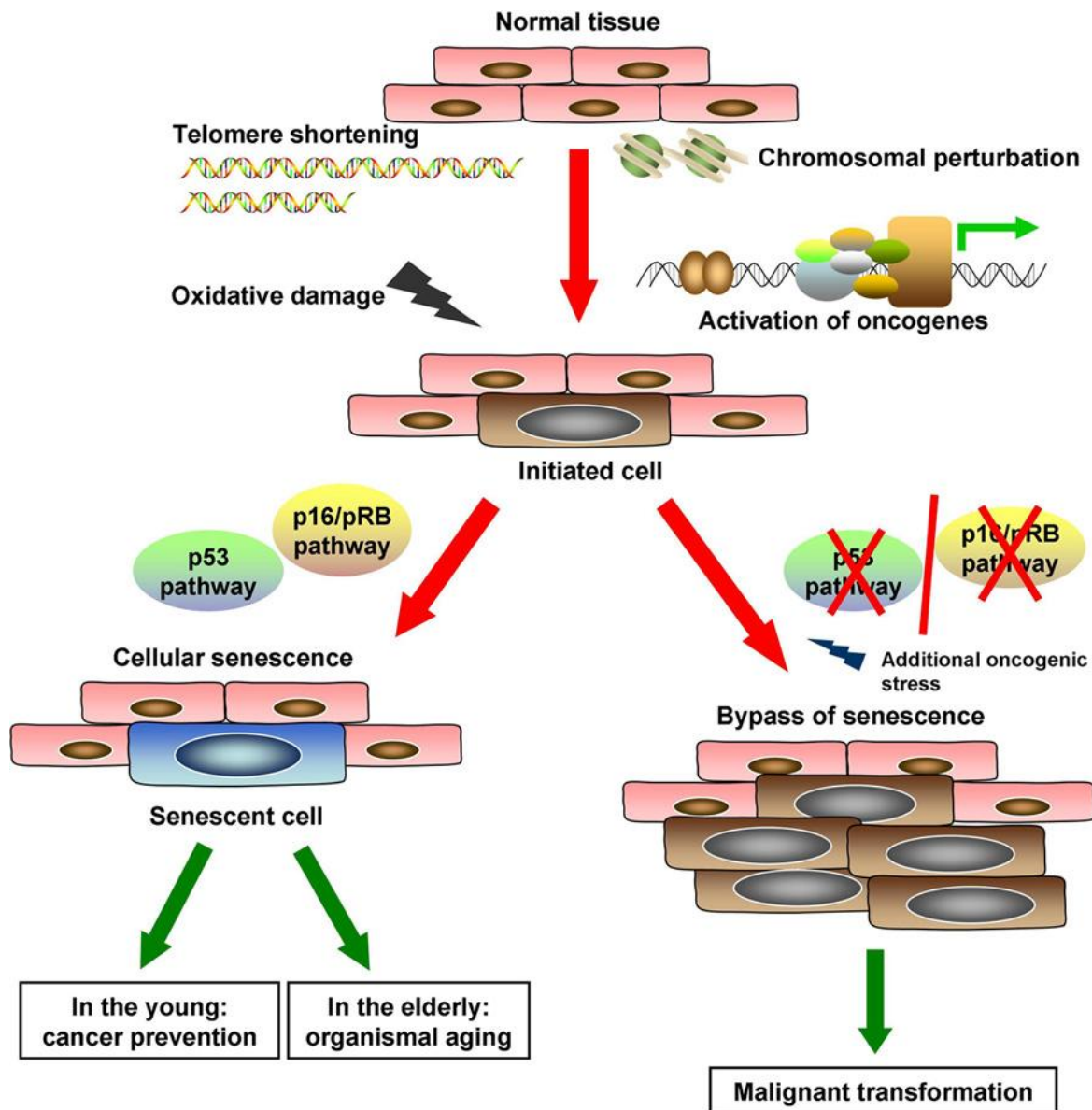


Abb. B.2: Ablauf der Seneszenz-Entwicklung. Durch Stress wird in einer Zelle Seneszenz ausgelöst. Doch durch Mutation der Signalwege p53 bzw. p16/pRB kann eine Zelle die Seneszenz umgehen und maligne transformieren (Shan et al., 2009).

Interessanterweise fiel bei Fibroblasten, in denen durch RNA-Interferenz die Expression von Cathepsin X herunterreguliert worden war, ein seneszenten Phänotyp der Zellen auf. Morphologisch waren die Zellen flach und vergrößert. Ihre Proliferation war reduziert und die Zellzyklusprogression verzögert. Außerdem waren die typischen Seneszenz-assoziierten Gene wie p16INK4a, p21CIP1 und Caveolin-1 hochreguliert (Kraus et al., 2011). Daher ist es interessant, herauszufinden, ob

Cathepsin-Defizienz auch in Prostatakarzinomzellen zelluläre Seneszenz auslösen kann.

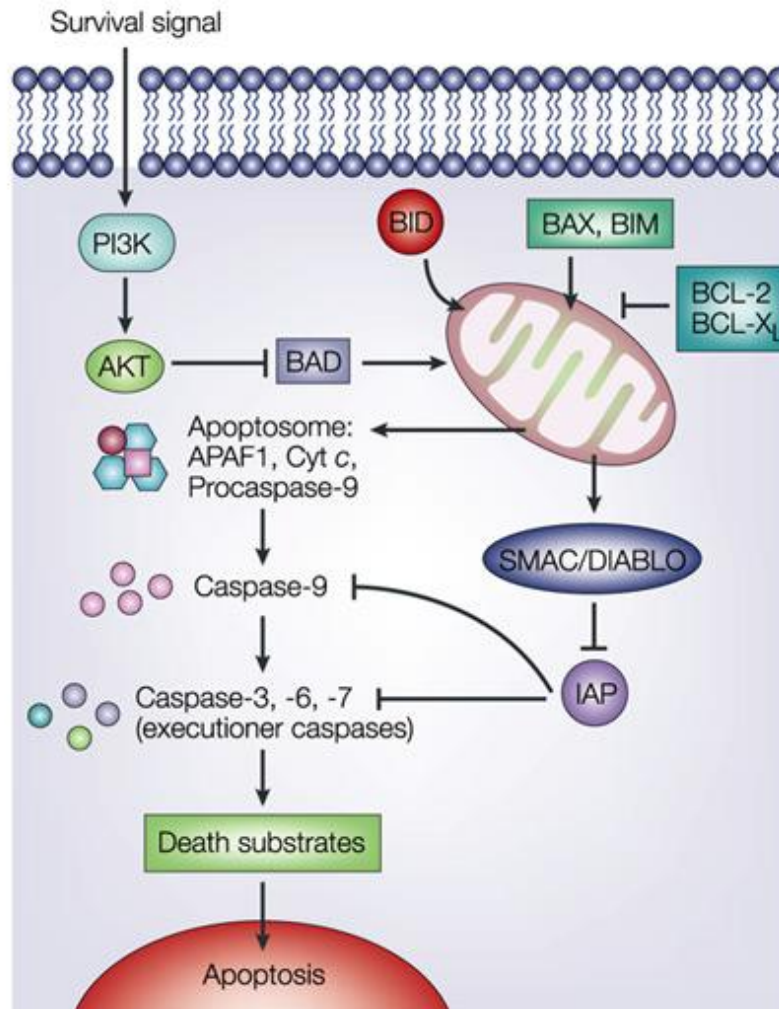
B.5. Apoptose

Klassischerweise wird der Tod von Zellen in zwei Kategorien eingeteilt: Apoptose und Nekrose. Apoptose ist ein physiologischer Prozess, bei dem eine Zelle programmiert untergeht, ohne die benachbarten Zellen zu beeinflussen, während Nekrose einen pathologischen Zelltod darstellt (Sato et al., 2016).

Apoptose ist ein wichtiger Faktor für die Gewebshomöostase, um in Geweben ein Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zelluntergang herzustellen. Während eine Zelle in Apoptose geht, kann man definierte morphologische Veränderungen beobachten. Zunächst kondensieren sich Zellkern und Zytoplasma, dann folgt das „Blebbing“ der Zellmembran, wobei die Plasmamembran viele Bläschen bildet. Daraufhin werden von der Zelle die Zellbestandteile in kleinen Vesikeln freigesetzt. Diese „Apoptosekörperchen“ werden dann von Phagozyten erkannt und abgebaut, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen (Favaloro et al., 2012).

Für die Auslösung von Apoptose wird die Aktivierung von Caspasen, einer Gruppe von Cysteinproteasen, benötigt. Sie spalten dann verschiedene Substrate, die zu den typischen Veränderungen bei Apoptose führen, und bauen Zellbestandteile ab. Es gibt zwei verschiedene Wege, wie diese Caspasen aktiviert werden können. Bei dem extrinsischen Pfad bindet ein Ligand, wie CD95 (APO-1/Fas) oder TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligands) extrazellulär an den Todesrezeptor der Zelle, den Fas-Rezeptor bzw. TRAIL-Rezeptor. Dieser aktiviert daraufhin die Initiatorcaspase 8, welche dann die Effektorcaspase 3 aktiviert und damit zu Apoptose führt. Der intrinsische Signalweg wird durch Strahlung, zytotoxische Substanzen oder andere Arten von zellulärem Stress verursacht. Dadurch kommt es zum Austritt von apoptogenen Faktoren wie Cytochrom C, Apoptose-induzierender Faktor und SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase) aus den Mitochondrien, welche daraufhin die Effektorcaspasen aktivieren. So bildet Cytochrom C mit Procaspase-9 einen Komplex – das Apoptosom –, wodurch Caspase-9 aktiviert wird und im Anschluss wiederum die Caspasen 3, 6 und 7. Der intrinsische Signalweg wird von den Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert, die sich an den Mitochondrien befinden (Abb. B.3). Es sind 25 Mitglieder bekannt, die entweder pro- oder anti-apoptotische Funktionen erfüllen. Zur anti-apoptotischen Gruppe gehören beispielsweise Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl1/A oder Bcl-B, während Bax, Bak, Bok, Bim, Bad und Bid pro-apoptotisch agieren, indem sie Löcher in der Mitochondrienmembran bilden, durch die Cytochrom C ins Zytosol austreten kann (Kang and Reynolds, 2009). Eine

Verbindung zwischen den beiden Pfaden ist beispielsweise das pro-apoptotische Protein Bid aus der Bcl-2-Familie. Es wird durch die extrinsisch aktivierte Caspase-8 in zwei Fragmente gespalten. Das C-terminale Fragment tBid – truncated Bid – transloziert zur äußeren mitochondrialen Membran, wo es zytosolisches Bax rekrutiert und dessen Homooligomerisierung fördert, wodurch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran entsteht, die zum Cytochrom C-Austritt führt (Wang and Tjandra, 2013).



Nature Reviews | Cancer

Abb. B.3: Signalwege der Apoptose. Die Proteine der Bcl-2-Familie regulieren den intrinsischen Signalweg, indem sie die Permeabilisation der Mitochondrienmembran fördern bzw. hemmen. Dadurch werden die Caspasen aktiviert und Apoptose ausgelöst (Igney and Krammer, 2002).

Das Protein Bad gehört auch zu den pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie. Wenn es beispielsweise durch AKT phosphoryliert wird, bildet Bad mit 14-3-3-Proteinen einen Komplex und ist inaktiv. Dephosphorylierung durch Calcineurin aktiviert Bad, welches dann ins Mitochondrium transloziert und dort die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL inhibiert (Malla et al., 2012).

Bei apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin an die äußere Seite der Plasmamembran transportiert und fungiert dort als Phagozytosesignal für Makrophagen. Somit wird verhindert, dass Zellorganellen in den Extrazellularraum gelangen. Bei Nekrose dagegen schwellen die Zellorganellen unkontrolliert an und die Plasmamembran reißt ein, wodurch sich Zellteile in der Umgebung verteilen und dort eine lokale Entzündungsreaktion auslösen (Chaabane et al., 2013).

Cathepsine besitzen in Bezug auf Apoptose scheinbar einen dualen Charakter. Bei lysosomaler Destabilisierung wird durch den Austritt von Cathepsinen ins Zytosol lysosomaler Zelltod ausgelöst. Dabei spielt das Ausmaß der lysosomalen Membranruptur eine große Rolle bei der Art des Zelltods. So führt ein starker Austritt von lysosomalen Inhalt ins Zytosol zu Nekrose, während begrenzter Austritt Apoptose oder Apoptose-ähnlichen Zelltod auslöst. Man geht davon aus, dass Cathepsine dabei die Hauptrolle spielen (Aits and Jaattela, 2013). Wenn Cathepsine ins Zytosol gelangen, spalten sie Bid und bauen anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie ab, wodurch Apoptose induziert wird (Repnik et al., 2012). Cathepsin L beispielsweise spaltet das proapoptotische Protein Bid zu tBid, sodass Cytochrom C aus den Mitochondrien austreten kann und Apoptose herbeiführt. Auch Cathepsin B wirkt proapoptotisch bei Autophagie und Immunantwort. Im Gegensatz dazu wurde jedoch in den letzten Jahren auch häufig festgestellt, dass Cathepsine Apoptose inhibieren können. So ist beispielsweise in Cathepsin L-Knockoutmäusen die Apoptoserate erhöht. In Prostatakarzinomzellen wurde durch die Herabregulation von MMP-9, uPAR und Cathepsin B Apoptose induziert (Gondi and Rao, 2013; Lankelma et al., 2010).

Die Eigenschaft von Zellen, beispielsweise bei Stress oder DNA-Schäden in Apoptose überzugehen, ist in den meisten Tumorzellen verändert oder abgeschwächt. In den meisten Malignomen ist beispielsweise p53, ein wichtiger Faktor zur Auslösung von Apoptose, mutiert (Fesler et al., 2016). Diese und viele andere Mutationen in den Krebszellen verschieben das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose in Richtung unkontrollierter Vermehrung und machen somit den Tumor dadurch häufig resistent gegen Chemotherapeutika. Denn die meisten Chemotherapeutika und auch die Strahlentherapie zielen auf Induktion von Apoptose in den schnell proliferierenden Tumorzellen ab. In Prostatakarzinomzellen gibt es viele Anomalitäten bezüglich Apoptose. So sind beispielsweise diverse anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie wie Bcl-2, Bcl-xL oder Bcl-w überexprimiert, und auf der anderen Seite der Todesrezeptor DR5 an der Zellmembran vermindert exprimiert. Doch die Androgeninhibitoren zur Behandlung von CRPC (Kastrations-resistentem Prostatakarzinom) zielen genau auf die durch Androgenentzug vermittelte Apoptose der Krebszellen ab (Zielinski et al., 2013). Deshalb ist es

wichtig, zusätzlich zu diesen Androgeninhibitoren therapeutische Stoffe zu finden, welche die antiapoptotischen Mutationen in den Krebszellen, die zu deren Resistenz gegen Apoptose führen, ausgleichen, damit die Tumorzellen effektiver vernichtet werden können.

Das IGF-System ist in Apoptosesignalwege involviert. Wenn IGF-I oder IGF-II an den IGF-I-Rezeptor binden und dieser phosphoryliert wird, aktiviert er die Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K), welche wiederum AKT phosphoryliert. Das Signalprotein AKT hemmt daraufhin die proapoptotischen Proteine Bad, Bim und Bax und trägt somit zu einer Inhibition von Apoptose bei (Moschos and Mantzoros, 2002).

B.6. IGF System und Signalweg

Das Insulin-like growth factor (IGF-) System erfüllt wichtige Funktionen für Wachstum, Entwicklung und Überleben. Es besteht aus den beiden Hormonen IGF-I und IGF-II, die zu 62% homolog zu Proinsulin sind, den Rezeptoren IGF-IR und IGF-IIR und sechs verschiedenen IGF-Bindeproteinen (IGF-BP).

IGF-I weist eine Serumkonzentration von ca. 100-200 ng/ml auf, die mit dem Alter abnimmt, und ist besonders wichtig für postnatales Wachstum und Entwicklung. IGF-II hingegen besitzt mit 400-600 ng/ml eine höhere Serumkonzentration und spielt eine besonders wichtige Rolle im embryonalen und fetalen Wachstum. So zeigte sich bei Mäusen mit reduziertem IGF-I-Spiegel ein Phänotyp mit vermindertem Gewicht und Knochendichte (Yakar et al., 2010). IGF-I wird zum größten Teil in der Leber synthetisiert, jedoch auch in anderen Geweben, während IGF-II in mehreren unterschiedlichen Geweben wie Leber, Muskelgewebe, Gehirn und Niere produziert wird (Zhang et al., 2013). Die Besonderheit an den IGFs ist somit, dass sie sowohl als endokrine Hormone Funktionen auf Organismusebene übernehmen, als auch als auto- bzw. parakrine Wachstumsfaktoren Funktionen auf Zellebene besitzen (Pollak, 2008). Im Serum sind 99% der IGFs an IGF-Bindeproteine gebunden, welche auf diese Weise die Halbwertszeit der IGFs verlängern, diese jedoch gleichzeitig den Rezeptoren schlechter zugänglich machen (Moschos and Mantzoros, 2002). Das am häufigsten vorkommende IGF-Bindeprotein ist IGFBP-3, welches auch IGF-unabhängig anti-proliferative Funktionen aufweist, wie beispielsweise die Stimulation von Apoptose und die Hemmung des Zellwachstums (Lima et al., 2009). Die IGFBPs werden von IGFBP-Proteasen abgebaut, zu denen unter anderem Serinproteasen, Cathepsine, MMPs und PSA gehören. Auf diese Weise führen diese Proteasen zu einer höheren Verfügbarkeit der IGFs. Beide Wachstumsfaktoren können – IGF-I jedoch mit höherer Affinität als IGF-II – an den IGF-IR binden, dessen Signalweg als Rezeptortyrosinkinase über den MAPK-Weg und den PI3K/AKT-Weg zu

Proliferation, Differenzierung, Invasion und Inhibition von Apoptose führt (Gusscott et al., 2016; Moschos and Mantzoros, 2002). Der IGF-IR besteht aus einer Alpha-Kette für die Ligandenbindung und einer Beta-Kette, welche als Tyrosinkinasedomäne fungiert. IGF-II kann zudem an den IGF-IIR binden, welcher den Liganden daraufhin internalisiert und im Lysosom abbauen lässt. Er löst keine Signaltransduktion aus, sondern reduziert die Bioaktivität von IGF-II und besitzt daher anti-proliferative und pro-apoptotische Eigenschaften (Pollak, 2008). Dieser IGF-IIR ist identisch mit dem großen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor an der Plasmamembran, der Proteine mit Mannose-6-Phosphat-Rest aus dem Extrazellulärraum wieder ins Lysosom internalisieren kann, wie beispielsweise sezernierte Cathepsine (Edwards and Murphy, 1998).

Das IGF-System spielt durch seine proliferativen und anti-apoptotischen Wirkungen eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese vieler Tumoren, insbesondere des Prostatakarzinoms. Der IGF-IR kommt in mehreren Tumoren in übermäßig erhöhter Expression vor, beispielsweise in Brust-, Prostata- und Darmkrebs. Laut epidemiologischen Studien gehen erhöhte Konzentrationen von IGF-I im Serum mit vergrößertem Risiko für die Diagnose dieser Krebserkrankungen einher (Arcaro, 2013; Roberts, 2004). Im Gegensatz dazu sind erhöhte Spiegel des IGFBP-3 mit vermindertem Risiko für Brust-, Prostata- und Darmkrebs assoziiert.

Prostatakarzinomzellen exprimieren bevorzugt in frühen Tumorstadien den IGF-IR und sezernieren selbst IGF-II, welches auf diese Weise autokrin das Wachstum der Krebszellen fördert. Bei den Stromazellen in der Nachbarschaft der Prostatakarzinomzellen wurde gezeigt, dass sie IGF-I und IGF-II produzieren und somit den Tumor parakrin stimulieren (Moschos and Mantzoros, 2002). IGF-I-Sekretion von Prostatakarzinomzellen selbst konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Iwamura et al., 1993). Die mitogene Wirkung von IGF-I erfolgt über den IGF-IR durch erhöhte DNA-Synthese, stimulierten Zellzyklusfortschritt und Hemmung von Apoptose. Außerdem führt IGF-I über den MAPK-Signalweg und PI3K/AKT-Signalweg zu nicht-Ligand-abhängiger Aktivierung des Androgenrezeptors, der in Prostatakrebs der wichtigste Rezeptor für Wachstum ist (Lima et al., 2009).

Sowohl Cathepsine als auch das IGF-System sind in Prostatakarzinomen stark exprimiert und übernehmen bedeutende Funktionen bei Tumorentwicklung und Tumorfortschritt. Wie bereits angedeutet, gibt es mehrere Möglichkeiten, wie Cathepsine mit dem IGF-System interagieren können. Zum einen werden Cathepsine in Tumoren häufig extrazellulär sezerniert und können dann mithilfe ihres Mannose-6-Phosphatrests wieder über den IGF-IIR bzw Mannose-6-Phosphat-Rezeptor an der Zellmembran in die Zelle internalisiert und im Lysosom in aktiver Form gelagert werden (Edwards and Murphy, 1998). Zum anderen werden die IGFs

im Serum zu 99% von IGF-Bindeproteinen gebunden, welche somit diese Wachstumshormone den Zellen schlechter zugänglich machen (Bach, 2015). Cathepsine sind unter anderem IGFBP-Proteasen, die diese IGFBPs abbauen und so zu einer verbesserten Verfügbarkeit der IGFs zu den Krebszellen führen könnten. Auf beide Weisen würden überexprimierte Cathepsine die proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften des IGF-Systems unterstützen. Dies zeigen auch die bisherigen Forschungsergebnisse: In Prostatakarzinomzellen, die mit Cathepsin X-spezifischer siRNA behandelt worden waren, um die Expression der Cysteinprotease herabzusetzen, war die Phosphorylierung des IGF-IR reduziert. Außerdem zeigten die Cathepsin X-defizienten Prostatakarzinomzellen leicht reduzierte Proliferation und verminderte Invasionsfähigkeit (Kraus et al., 2012).

B.7. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Der Hintergrund dieser Doktorarbeit war die Tatsache, dass in Prostatakarzinomzellen eine verstärkte Expression von Cathepsin X stattfindet. In den letzten Jahren wurden bereits einige Funktionen von Cathepsin X in Prostatakarzinomen nachgewiesen, wie die Beteiligung an Invasions- und Migrationsprozessen und Beeinflussung des IGF-Signalwegs. Dennoch stellte sich die Frage, ob Cathepsin X an weiteren Funktionen in Prostatakarzinomzellen beteiligt ist und ob sich diese Funktionen auch bei den in Prostatakarzinomzellen ebenfalls stark exprimierten Cathepsinen B, L und K nachweisen lassen. Daher wurden folgende Ziele der Arbeit formuliert:

1. Downregulation der Cathepsine X, B, L oder K in Prostatakarzinomzellen

Zunächst sollte als Grundlage für die weiteren Experimente die Downregulation der Cathepsine X, B, L oder K in Prostatakarzinomzellen (PC-3, LNCaP) erfolgen. Dazu sollten zwei verschiedene Methoden verglichen werden: der Knockdown der Cathepsine auf mRNA-Ebene mittels RNA-Interferenz und die Inhibition auf Proteinebene mittels Cysteinproteaseinhibitoren.

2. Charakterisierung der Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen

Im nächsten Schritt sollten die Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen im Hinblick auf ihre Proliferation, Seneszenz und Apoptose charakterisiert werden, da sich bei Versuchen mit Cathepsin X-defizienten Fibroblasten ein seneszenten Phänotyp und eine verringerte Proliferation gezeigt hatten. Dabei war zudem wichtig, zu sehen, ob sich die verschiedenen Cathepsine in ihren Effekten unterscheiden oder nicht.

3. Untersuchung der durch Cathepsin-Defizienz beeinflussten Signalwege

Zuletzt sollte der IGF-Signalweg als einer der wichtigsten für Proliferation und Apoptose verantwortlicher Signalweg in den Cathepsin-defizienten Zellen genauer untersucht werden, um dort Unterschiede der Aktivierung von Signalmolekülen – insbesondere des MAPK-Signalwegs und des PI3K/AKT-Signalwegs – zu entdecken.

C. Material und Methoden

C.1. Material

C.1.1. Geräte

CO2-Inkubator: Heracell 240i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dampfsterilisator: Varioklav	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
DNA-Elektrophorese-Apparatur	Peqlab, Erlangen
Eismaschine	Tritec, Hannover
ELISA Reader: Multiscan FC	Thermo scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop: AxioObserver 1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Gefrierschrank (-80°C)	GFL, Burgwedel
ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Inkubator	Memmert Elektronik, Schwabach
LightCycler	Roche, Mannheim
Magnetrührer	AxonLab, Baden-Dättwil, Schweiz
Mikroskop	Leitz, Stuttgart
Mikrowelle	Siemens, München
Orbitalschüttler: Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
PeqStar2x	Peqlab, Erlangen
pH-Meter: inoLab	WHW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Semidry-Blot-Geräte	Whatman Biometra, Göttingen
SensiCam (Video Graphic Printer)	Sony, Minato, TKY, Japan
Spannungsquellen: E 802	Consort, Turnhout, Belgien
Spektrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Spektrophotometer Nano-Drop-Lite	Thermo Scientific, Waltham, USA
Stickstofftank	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich

Ultraschallgerät: Sonifier B-22	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Vortex Genie-2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen	Kern, Balingen & Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkultur Sterilbank: HeraSafeKS	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Jouan	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Universal 16R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen

C.1.2. Bioinformatik

Axiovision Rel 4.8.2.0	Carl Zeiss AG, Oberkochen
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego
ImageJ	National Institutes of Health, USA
LightCycler Software 3.5.	Roche, Mannheim
Photoshop CS 5 (64 bit)	Adobe Systems GmbH, München
SkanIt Software 2.5.1 for Multiskan FC	Thermo Scientific, Waltham, USA
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim

C.1.3. Zelllinien

LNCaP-Zellen	ATCC, Manassas, USA
PC 3-Zellen	ATCC, Manassas, USA

C.1.4. Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgelistet sind, hatten p.a.-Qualität und wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

C.1.4.1. Zellbiologie

Accutase	PAA, Linz, Österreich
Chamberslides	BD Biosciences, Bedford, USA

FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
Kryoröhrchen	Thermo Scientific, Waltham, USA
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA, Linz, Österreich
PBS ohne Ca und Mg	Biochrom, Berlin
RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Trypan-Blau	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA	PAA, Linz, Österreich
Zellkulturflaschen	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

C.1.4.2. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für quantitative RT-PCR für Cathepsin X und GAPDH wurden von der Firma Search-LC (Heidelberg) bezogen. Alle weiteren Oligonukleotide stammten von Qiagen (Hilden).

Alle Sequenzen der siRNA Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung aufgeführt.

Negativkontrolle (Non-silencing siRNA)

Zielsequenz	AAT	TCT	CCG	AAC	GTG	TCA	CGT
Sense	UUC	UCC	GAA	CGU	GUC	ACG	UdTdT
Antisense	ACG	UGA	CAC	GUU	CGG	AGA	AdTdT

siRNA Cathepsin X 304

Zielsequenz	AAC	GGA	TCG	GAT	CAA	CAT	CAA
Sense	CGG	AUC	GGA	UCA	ACA	UCA	AdTdT
Antisense	UUG	AUG	UUG	AUC	CGA	UCC	GdTdT

siRNA Cathepsin B: Hs_CTSB_7

Zielsequenz	CAG	GAT	CAC	TGT	GGA	ATC	GAA
-------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Sense	GGA	UCA	CUG	UGG	AAU	CGA	ATT
Antisense	UUC	GAU	UCC	ACA	GUG	AUC	CTG

siRNA Cathepsin L: Hs_CTSL_5

Zielsequenz	AAG	GCG	ATG	CAC	AAC	AGA	TTA
Sense	GGC	GAU	GCA	CAA	CAG	AUU	ATT
Antisense	UAA	UCU	GUU	GUG	CAU	CGC	CTT

siRNA Cathepsin K: Hs_CTSK_1

Zielsequenz	CCG	CAG	TAA	TGA	CAC	CCT	TTA
Sense	GAC	GUA	AUG	ACA	CCC	UUU	ATT
Antisense	UAA	AGG	GUG	UCA	UUA	CUG	CGG

Kontroll- siRNA AF488

Qiagen, Hilden

C.1.4.3. Molekularbiologie

Agarose	Biozym, Hameln
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HiPerfect	Qiagen, Hilden
iScript cDNA Synthesis Kit	Biorad, Hercules, USA
Light Cycler Kapillaren	Roche, Mannheim
PCR-grade water	Roche, Mannheim
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roche Sybr Green	Roche, Mannheim

C.1.4.4. Proteinchemie

3xSDS-Probenpuffer	Cell Signaling, Danvers, USA
Ac-DEVD-AFC	Ana-Spec, Fremont, USA

Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit	Promokine, Heidelberg
BCA-Assay-Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
BSA	PAA, Linz, Österreich
CA-074	Bachem, Bubendorf, Schweiz
CA-074-Me	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim
E64	Bachem, Bubendorf, Schweiz
E-64d	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Entwickler-Lösung	Kodak, Rochester, USA
Filme	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Filterpapiere, Whatman 1	Whatman Biometra, Göttingen
Fixierer- Lösung	Kodak, Rochester, USA
Fotokassette	Amersham Pharmacia Biotech
Human Cathepsin B ELISA Kit	Boster Biological Technology
Human Cathepsin L ELISA Kit	IBL, Hamburg
Nitrocellulose Protran BA 85	Whatman Biometra, Göttingen
Prolong Gold	Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail III	Calbiochem, San Diego, USA
SDS-Elektrophoresekammer	Biorad, Hercules, USA
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific, Waltham, US
Z-VAD-FMK	Bachem, Bubendorf, Schweiz

C.1.4.5. Antikörper und Konjugate

Kaninchen Anti-AKT	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Bax	BD Biosciences, Bedford, USA
Kaninchen Anti-Bcl-2	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Bid	BD Biosciences, Bedford, USA
Kaninchen Anti-Cathepsin B	Calbiochem, San Diego, USA
Kaninchen Anti-IGF-I Rezeptor β	Cell Signaling, Danvers, USA

Kaninchen Anti-MEK 1/2	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-p44/42 MAP Kinase	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Phospho-AKT	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Phospho-IGF1 Rezeptor β	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Phospho-MEK 1/2	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen Anti-Procathepsin X	Nägler et al., 2006
Maus Anti-GAPDH	Calbiochem, San Diego, USA
Pferd Anti-Maus IgG-HRP	Cell Signaling, Danvers, USA
Ziege Anti-Kaninchen IgG-HRP	Cell Signaling, Danvers, USA

C.2. Methoden

C.2.1. Zellbiologische Methoden

C.2.1.1. Zellkultur

Die PC3-Zellen und LNCaP-Zellen wurden in RPMI 1640 – Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Natrium-Pyruvat und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren in 75 cm² Flaschen kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium aus der Flasche abgesaugt, dann die Zellen mit 5 ml sterilem PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurde die Flasche mit 2 ml 2xTrypsin-EDTA oder 5 ml Accutase bei 37°C für 5 min inkubiert und im Mikroskop überprüft, ob sich die Zellen abgelöst haben. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von 4 ml vorgewärmten Zellkulturmedium inaktiviert und es wurden 10 µl von der Suspension zur Zellzahlbestimmung abgenommen. Die Zellsuspension wurde daraufhin in einem 15 ml – Falcon für 5 min bei 400 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet abgesaugt und das Pellet dann in 1 ml vorgewärmten Zellkulturmedium aufgelöst. In die neue Zellkulturflasche wurden 10 ml vorgewärmtes Medium und 300.000 bis 1.000.000 Zellen pipettiert und die Flasche dann bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

C.2.1.2. Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension vor der Zentrifugation abgenommen und mit 10 µl Trypanblau gemischt, wodurch die toten Zellen blau angefärbt wurden. Dann wurden 10 µl dieser Suspension auf eine Neubauer'sche Zählkammer aufgetragen. Die Zellen in 2 Feldern wurden gezählt und der Wert mit dem Faktor 10.000 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro Milliliter zu berechnen.

C.2.1.3. Stimulation der Zellen mit IGF-I und IGF-II

Für Stimulationsversuche wurden 100.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und für mindestens 6 Stunden unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Sobald die Zellen adhären waren, wurde das Zellkulturmedium durch RPMI 1640 ohne Zusätze ersetzt, sodass die Zellen über Nacht 14-16 Stunden hungerten. Nach 14 bis 16 Stunden erfolgte die Stimulation mit 50 ng/ml IGF-I oder 200 ng/ml IGF-II, welche in RPMI 1640 ohne Zusätze verdünnt waren. Als Kontrolle wurde RPMI 1640 ohne Zusätze verwendet. Bei Versuchen zur Zeitkinetik wurden Zeitpunkte zwischen

5 und 60 Minuten getestet, woraus sich als beste Stimulationszeiten 20 Minuten für IGF-I und 10 Minuten für IGF-II ergaben.

C.2.1.4. siRNA-Transfektion von Prostatakarzinomzellen

Um einen Knockdown der Cathepsine B, L, K und X in den PC3-Zellen zu erreichen, wurden die Zellen mit den entsprechenden siRNAs in einer Konzentration von 10 nM transfiziert. Als Kontrolle wurde eine non-silencing siRNA verwendet, für die es im humanen Genom keine Zielsequenz gibt.

Zunächst wurden 150.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und nach 6 Stunden Inkubation transfiziert. Die Transfektionslösung bestand aus 90 µl RPMI 1640 ohne Zusätze, der jeweiligen siRNA gegen Cathepsin X, B, L oder K in der Zielkonzentration von 10 nM und 18 µl HiPerFect Transfektionsreagenz pro Well. Nach Herstellung des Transfektionsmixes wurde dieser 30 s lang gevortext und dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Komplexe aus siRNA und HiPerFect bilden konnten. Daraufhin wurde jede Vertiefung der 6-Well-Platte mit der Transfektionslösung versetzt und die 6-Well-Platten wieder bei 37°C inkubiert. Nach einem Tag konnte die Transfektionseffizienz bei den Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden, die mit der fluoreszenten siRNA AF488 am Vortag transfiziert worden waren. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und für weitere Versuche verwendet.

C.2.1.5. Behandlung der Prostatakarzinomzellen mit Cysteinproteaseinhibitoren

Zur Inhibition der Cathepsinaktivität auf Proteinebene wurden die Prostatakarzinomzellen mit Cysteinproteaseinhibitoren behandelt. E-64 ist ein unspezifischer Cysteinproteaseninhibitor und E-64d ein zellgängiges Derivat von E-64, während CA-074 ein Cathepsin B spezifischer Inhibitor ist und CA-074-Me sein zellgängiges Derivat. Es wurden 150.000 PC3-Zellen pro Vertiefung einer 6-Wellplatte ausgesät und nach 6 Stunden mit 10 µM E-64, 5 µM E-64d, 10 µM CA-074 bzw. 5 µM CA-074-Me behandelt und bei 37°C inkubiert. Bei LNCaP-Zellen betrugen die Konzentrationen bei allen Inhibitoren 5 µM mit Ausnahme von CA-074-Me, dessen Konzentration bei 1 µM lag. Nach 15-24 Stunden wurden die Zellen dann geerntet und für weitere Experimente verwendet.

C.2.1.6. Annexin V-Färbung zur Apoptosemessung

Um einen Überblick über die Apoptose in den Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen zu erhalten, wurde der „Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit“ von Promokine verwendet. Dazu wurden zunächst 15.000 PC3-Zellen pro Well in 12-Wellplatten ausgesät und transfiziert. Als Positivkontrolle wurde eine Vertiefung mit „Non-silencing“-Zellen 6 Stunden vor der Färbung mit 500 nM Staurosporin zur Apoptoseinduktion stimuliert. Für die Färbung wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers mit jeweils 5 % FITC-Annexin V, Ethidium Homodimer III und Hoechst 33342 in Bindepuffer für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop mit den Filtern GFP, Cy3 und DAPI ausgewertet. Die Zellkerne aller Zellen waren durch den membranpermeablen Hoechstfarbstoff blau gefärbt, die apoptotischen Zellen durch Annexin V grün und die nekrotischen Zellen durch Ethidium Homodimer III rot angefärbt sichtbar. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, welches in apoptotischen Zellen in die äußere Zellmembran eingebaut wird, während der nicht-zellgängige Farbstoff Ethidium Homodimer III DNA färbt, die bei Nekrose in die Zellumgebung verbreitet wird. Zur quantitativen Auswertung wurde die Ratio aus den apoptotischen Zellen und der gesamten Zellzahl pro Bild anhand der Auszählung mehrerer Gesichtsfelder gebildet.

C.2.1.7. TUNEL Assay

Für den TUNEL-Assay zur Detektion von Apoptose wurde der „In Situ Cell Death Detection Kit“ von Roche verwendet. Die Zellen wurden dazu in „Chamberslides“ (40.000 Zellen/Kammer) ausgesät und über Nacht kultiviert. Zellen, die mit siRNA transfiziert worden waren, wurden am 3. Tag nach Transfektion in „Chamberslides“ umgesetzt und der Assay am darauffolgenden Tag durchgeführt. Eine Behandlung der Zellen mit Cysteinproteaseinhibitoren erfolgte für 48 Stunden vor der Durchführung des TUNEL-Assays. Die Zellen wurden mit 4% PFA in PBS, pH 7,4, fixiert, danach nach den Angaben des Herstellers blockiert (Methanol, 3% H₂O₂), permeabilisiert (0,1% Triton X-100, 0,1% Natriumcitrat in PBS) und mit dem TUNEL-Mix (Label-Lösung und Enzymlösung von Roche) für 60 min inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde nur „Label“-Lösung benutzt und die Positivkontrolle wurde mit DNase behandelt. Zuletzt wurden die Zellen mit DAPI gegengefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur quantitativen Auswertung wurde der Quotient aus den apoptotischen Zellen und der gesamten Zellzahl pro Bild berechnet.

C.2.1.8. BrdU ELISA

Für den BrdU-Proliferations-ELISA wurden die Zellen in Triplikaten von je 2000 Zellen pro Well – in einem Volumen von 100 µl – in einer 96-Well-Platte ausgesät. Als Leerwert wurden 100 µl Medium verwendet. Bei Versuchen mit transfizierten Zellen wurden diese am dritten Tag nach Transfektion in die Mikrotiterplatte umgesetzt, während bei Versuchen mit Cysteinproteaseinhibitoren die Zellen in der Platte 6 Stunden nach Aussaat für 4 Tage mit Inhibitoren (s. C.2.1.5.) behandelt wurden, wobei jeden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die 96-Well-Platte wurde ca. 24 Stunden über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Stimulationsversuche wurden die Zellen mit 50 ng/ml IGF-I oder 200 ng/ml IGF-II für 24 Stunden stimuliert. Die Proliferation der Prostatakarzinomzellen wurde mit dem kolorimetrischen Cell Proliferation ELISA anhand der Messung der Inkorporation des Nukleotidanalogs Bromodeoxyuridin (BrdU) in die DNA während der DNA-Synthese der Zellen bestimmt, indem die Zellen mit 10 µM BrdU für 2 Stunden inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers fixiert, mit Peroxidasegekoppelter Anti-BrdU-Lösung inkubiert, gewaschen und mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Die Substratreaktion wurde mit 0,5 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorptionen bei 450 nm in einem ELISA Reader gemessen.

C.2.1.9. CyQuant Assay

Als zweiter Proliferationsassay wurde der CyQuant NF Assay verwendet, dessen fluoreszenter Farbstoff in die DNA interkaliert und somit die Zellzahl darstellt, die mittels einer Zeitkinetik bestimmt wird. Dazu wurden 2.000 PC3- bzw. LNCaP-Zellen pro Well einer sterilen 96-Wellplatte ausgesät und nach 6 Stunden mit den Cysteinproteaseinhibitoren E-64, E-64d, CA-074 und CA-074-Me in den Konzentrationen behandelt, die in C.2.1.5. genannt sind. Nach 3, 24, 48 und 96 Stunden wurde jeweils eine Platte mit PBS gewaschen und bei -80°C gelagert. Alle Mikrotiterwellplatten wurden gemeinsam aufgetaut und die Zellen mit 0,5 mg/ml RNase A im HBSS-Puffer für 45 Minuten behandelt, um den Fluoreszenzhintergrund durch RNA zu verringern. Daraufhin wurden die Zellen im hinzupipettierten NF-Farbstoff in HBSS-Puffer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Fluoreszenz im Fluoreszenzreader bei den Wellenlängen λ (Exzitation) = 485 nm und λ (Emission) = 530 nm gemessen.

C.2.2. Molekularbiologische Methoden

C.2.2.1. RNA-Isolierung aus Prostatakarzinomzellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt, dann wurden die Zellen mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und daraufhin trypsinisiert. Sobald die Zellen abgelöst waren, wurde neues Zellkulturmedium hinzugegeben und die Suspension – nach Bestimmung der Zellzahl - sodann in einem 15ml-Falkon zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml Medium aufgelöst und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert, welches dann bei 400g 5 Minuten lang zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde bei -80°C bis zur weiteren Benutzung eingefroren. Für weniger als 5.000.000 Zellen im Eppendorfgefäß wurde das Pellet mit 350 µl RLT-Puffer durch 1% Beta-Mercaptoethanol lysiert. Bei Zellen, die auf 6-Well-Platten wuchsen, wurde das Medium ebenfalls abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Dann wurden 350 µl RLT-Puffer mit Beta-Mercaptoethanol in jedes Well pipettiert und die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Das Lysat wurde entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Aus den RLT-Lysaten wurde nach Angaben des Herstellers RNA isoliert.

Zur Messung der Konzentration der RNA in der Probe wurde ein Photometer benutzt. 50 µl der Probe wurden in eine Küvette pipettiert und die Absorption bei 260 nm gemessen. Als Leerwert wurden 50 µl RNase-freies Wasser verwendet. Am Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ war erkennbar, ob die RNA-Probe mit Protein kontaminiert war. Da die Werte stets in dem sehr guten Bereich von über 2,0 lagen, bestand bei den Proben keine Kontamination mit Proteinen.

C.2.2.2. cDNA-Synthese

Um die gewonnene RNA in cDNA umzuschreiben, wurden der cDNA-Synthesekit von Biorad und die RNA-Proben benutzt. In ein PCR-Gefäß wurden zunächst 4 µl 5x iScript Reaktionsmix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase pipettiert. Dann wurde das Volumen einer RNA-Probe hinzugegeben, das einer Menge von 1 µg entsprach, und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Das Röhrchen wurde dann in ein PCR-Gerät gestellt und dort für 5 Minuten auf 25°C erwärmt, dann für 30 Minuten auf 42°C und zuletzt für 5 Minuten auf 85°C erhitzt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

C.2.2.3. Quantitative PCR

Für die quantitative PCR wurden die cDNA-Proben mit Nuklease-freiem Wasser 1:50 verdünnt und 5 µl davon in Glaskapillaren pipettiert. Als Kontrolle wurde 5 µl Wasser und als Standard 5 µl von drei Standardproben in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 verwendet. Der Reaktionsmix, welcher aus 3 µl Wasser, 1 µl des entsprechenden Primers und 1 µl MasterMix SYBR Green bestand, wurde daraufhin jeder Kapillare beigefügt, die Kapillaren wurden verschlossen und bei 660 rpm und 4°C 10 Minuten lang zentrifugiert. Dann wurden die Kapillaren in das LightCycler Gerät gestellt und das Programm für RT-PCR gestartet, das bei Search-LC-Primern aus 10 Minuten Denaturierung bei 95°C, 45 Zyklen Amplifizierung mit Denaturierung bei 95°C, Hybridisierung der Primer bei 68°C und Synthese bei 72°C und der Schmelzkurve mit kontinuierlicher Erhitzung bis 95°C und daraufhin einsetzendem Abkühlen auf 40°C bestand. Bei Primern von Qiagen dauerte die Denaturierungsphase zu Beginn 15 Minuten und die Temperaturen der Amplifizierungsphase waren 94°C – 55°C – 72°C, wobei die anderen Konditionen die gleichen waren.

C.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Um die Ergebnisse der RT-PCR zu visualisieren, wurden die PCR-Produkte nach Durchlauf der RT-PCR auf ein Agarosegel aufgetragen. Dazu wurden die Kapillaren nach der quantitativen PCR zunächst bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Dann wurde ein 2%iges Agarosegel mit 100 ml TAE-Puffer und 5 µl Ethidiumbromid gegossen. Die Kapillaren wurden geöffnet und umgedreht in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 1 Minute bei 1.000 rpm zentrifugiert. Jeweils 5 µl Probe wurden mit 1 µl 6xProbenpuffer mit Orange-G versetzt und auf das Gel aufgetragen. Das Gel war mit 1xTAE-Puffer bedeckt und lief bei 90 V für 30 bis 60 Minuten. Zur Auswertung der Banden wurde das Gel auf einem Transilluminator mit UV-Licht beleuchtet.

C.2.3. Proteinchemische Methoden

C.2.3.1. Proteinextraktion aus Prostatakarzinomzellen

Zur Herstellung von Zelllysaten aus Zellen in Kultur in 6-Well-Platten wurden die adhärennten Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann 200 µl nicht-denaturierender Proteinlysispuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 6,0) mit 1% Proteaseinhibitorcocktail pro Well hinzugegeben und die

Zellen mithilfe eines Zellschabers in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Bei der Herstellung von Zelllysaten aus Zellpellets wurde 1 ml Proteinlysispuffer mit 1% Proteaseinhibitor-Cocktail pro 5.000.000 Zellen zum Pellet hinzugegeben. Die Lysate wurden 10 Minuten lang auf Eis inkubiert und alle 2 bis 3 Minuten kurz gevortext. Danach wurden sie für dreimal 2 Sekunden mit einer Ultraschallsonde behandelt, sofort wieder auf Eis gestellt und für 5 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und entweder bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverwendet zur Proteinkonzentrationsbestimmung oder SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Für die Herstellung von Lysaten zur Untersuchung von Phosphorylierungszuständen nach Stimulationsversuchen wurden die Zellen mit eiskaltem PBS mit 200 µM Natriumorthovanadat gewaschen, um den Abbau der Phosphatreste durch Phosphatasen zu verhindern. Daraufhin wurden 200 µl Probenpuffer (1/3 3xProbenpuffer, 2/3 destilliertes Wasser, 40 mM DTT, 1 mM Natriumorthovanadat und 1% Proteaseinhibitorcocktail) in das Well pipettiert. Mithilfe eines Zellschabers wurde das Lysat in ein Eppendorfgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Dann wurde das Lysat für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, dreimal 2 Sekunden lang mit einer Ultraschallsonde behandelt, 5 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Danach wurden die Proben sofort auf ein SDS-Gel aufgetragen und der Rest bei -80°C eingefroren, um einen weiteren Abbau der Phosphorylierungen zu verhindern.

C.2.3.2. Isolation des Zellkulturüberstands

Um Proteine im Zellkulturüberstand zu messen, wurde 1 ml Überstand von den kultivierten Zellen abgenommen und für 5 Minuten bei 1.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und dann entweder bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverwendet zur Proteinkonzentrationsbestimmung oder SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

C.2.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Bei den Zelllysaten, die mit dem nicht-denaturierenden Proteinlysispuffer gewonnen wurden, konnte die Gesamtproteinkonzentration bestimmt werden. Dies geschah mithilfe des BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers. Als Proben wurden 10 µl 1:10-verdünnter Zelllysate in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und jeweils 200 µl BCA-Reagenz hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Platte in einem ELISA Reader bei 550 nm gemessen.

C.2.3.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die SDS-PAGE wurden je nach Größe des im Immunoblot zu detektierenden Proteins 10- bis 15%ige Polyacrylamidgele verwendet (Tab. C.1).

	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12%	15%	
Aqua dest.	4,84 ml	4,2 ml	3,5 ml	2,5 ml	5,125 ml
Puffer (pH 6,8 bzw. 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
30 % Acrylamid	2,66 ml	3,33 ml	4 ml	5 ml	2,2 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Tab. C.1: Pipettierschema für die Herstellung von Gelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE. Es sind die Volumenangaben der Komponenten für Polyacrylamidgele verschiedener Konzentrationen eingetragen. Die Volumina reichen für 2 Trenngele mit 0,75 mm Dicke bzw. für ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke.

Dazu wurde stets Trenn- und Sammelgel einzeln nacheinander gegossen. Der Trenngelpuffer enthielt 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, während der Sammelgelpuffer aus 0,5M Tris/HCl, pH 6,8 war. Durch die Zugabe von 10%igem Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisierung des Acrylamids ausgelöst. Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proben von 20 µg Protein mit 3x SDS Probenpuffer mit 15% DTT versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Bei bereits mit SDS Probenpuffer lysierten Proben wurden aufgrund der unbekannten Proteinkonzentration 20 µl Lysat verwendet. Die Proben wurden für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, auf das Gel aufgetragen und die Gelelektrophorese in der mit Elektrodenpuffer (0,25 M Tris-Base, 1,92 M Glycin, 1% SDS, pH 8,3) gefüllten Elektrophoresekammer bei 100 bis 120 V für ca. 1 bis 2 Stunden je nach Größe des zu detektierenden Proteins durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde mit dem Gel sofort ein Western Blot angefertigt, um die aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen.

C.2.3.5. Immunoblot

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden das Gel, die Nitrocellulosemembran und Whatman-Filterpapiere für 5 Minuten im Blottingpuffer (45 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0,00375 % SDS, 20 % Methanol, pH 8,3) äquilibriert und anschließend im semi-dry-Verfahren folgendermaßen angeordnet: Anode – 9 Filterpapiere Whatman 1 – Nitrocellulose – Gel – 9 Filterpapiere Whatman 1 –

Kathode. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 mA für 1 bis 3 Stunden, abhängig vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zunächst für 5 Minuten in TBS-Lösung gewaschen, während das Gel entweder verworfen oder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt wurde. Die Membran wurde dreimal für 15 Minuten in TBST (65 mM Tris/HCl, 0,2 M NaCl, 0,05 % Tween), pH 7,4 mit 3% BSA blockiert und dann über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper, welcher in TBST mit 3% BSA in den in Tab. C.2 genannten Verdünnungen gelöst war, inkubiert. Die nicht-gebundenen Antikörper wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen und daraufhin die Membran dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Membran wurde für eine Stunde mit dem sekundären HRP (horse radish peroxidase)-gelinkten Antikörper, welcher 1:20.000 in TBST verdünnt war, inkubiert und nochmals mit destilliertem Wasser und dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Hierauf wurde die Membran für 5 Minuten im Dunkeln mit einer Luminollösung inkubiert und dann zur Detektion der Proteinbanden ein Röntgenfilm aufgelegt. Für die Auswertung wurde die Bandendichte stets mithilfe des Programms Image-J bestimmt und auf die Werte des Housekeeping-Gens GAPDH normiert.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
AKT	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Bax	Kaninchen	1:1000	BD Biosciences, Bedford, USA
Bcl-2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Bid	Kaninchen	1:1000	BD Biosciences, Bedford, USA
Cathepsin B	Kaninchen	1:1000	Calbiochem, San Diego, USA
IGF-I Rezeptor β	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
MEK 1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
p44/42 MAP Kinase	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-AKT	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-IGF1 Rezeptor β	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-MEK 1/2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAP Kinase	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Procathepsin X	Kaninchen	1:3000	Nägler et al., 2006
GAPDH	Maus	1:10.000	Calbiochem, San Diego, USA
Maus IgG-HRP	Pferd	1:20.000	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:20.000	Cell Signaling, Danvers, USA

Tab. C.2: Verdünnungen der im Western Blot verwendeten Antikörper. Details siehe Text. Die genaue Bezeichnung der Antikörper ist in C.1.4.5. angegeben.

C.2.3.6. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Das SDS-Gel wurde nach dem Proteintransfer entweder verworfen oder mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst für 15 Minuten in eine Fixierlösung (10% (v/v) Essigsäure, 25% (v/v) Isopropanol) gelegt, dann für 10 Minuten in die Färbelösung (7% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol, 0,025% (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250) und danach für 1 Stunde in eine Entfärbelösung (7% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol). Anschließend wurde das Gel für 30 Minuten in eine Trocknungslösung (20% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Glycerol) gelegt und dann über Nacht in einer Halterung zwischen 2 Plastikfolien getrocknet.

C.2.3.7. Quantitative Bestimmung von Cathepsin B mittels ELISA

Verwendet wurde der „Human Cathepsin B ELISA Kit“ von Boster Biological Technology nach Angaben des Herstellers. In eine mit anti-humanen Cathepsin B-Antikörper vorbeschichtete 96-Wellplatte wurde eine Standardreihe, ein Leerwert und die Zelllysate in 1:10- und 1:100-Verdünnungen pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt 90 Minuten bei 37°C inkubiert, dann in jedes Well biotinylierte anti-humanen Cathepsin B Antikörper Arbeitslösung pipettiert und wieder für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde daraufhin dreimal mit 0,01 M TBS (1,2g Tris, 8,5g NaCl, pH 7,4) gewaschen und mit Avidin-Biotin-Peroxidase Complex Lösung für 30 Minuten inkubiert. Nach 5 weiteren Waschschritten wurde die Platte mit dem TMB-Reagenz 25 Minuten lang bei 37°C im Dunkeln inkubiert, dann wurde die Reaktion mit TMB-Stopplösung gestoppt und im ELISA Reader bei 450 nm ausgewertet.

C.2.3.8. Quantitative Bestimmung von Cathepsin L mittels ELISA

Für die Messung der Konzentration von Cathepsin L in den transfizierten PC3-Zelllysaten wurde der „Human Cathepsin - L – ELISA“ von IBL verwendet. Dazu wurden die Wells einer mit Anti-Cathepsin L Antikörper bedeckten Mikrowellplatte mit Leerwert, Cathepsin L-Standard von 3,12 bis 50 ng/ml und den verdünnten Lysatproben gefüllt. Die Proben wurden anschließend mit Biotin-konjugiertem Anti-Cathepsin L Antikörper und daraufhin mit HRP-gelinktem Streptavidin inkubiert. Die Substratreaktion erfolgte mit Tetramethylbenzidin (TMB) und wurde nach 10 Minuten gestoppt, um die Absorption bei 450 nm in einem ELISA Reader zu messen.

C.2.3.9. Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen an PC3-Zellen wurden durchgeführt, um bestimmte Proteine in den Zellen zu lokalisieren. Dazu wurden die zu testenden Zellen in Chamberslides (40.000 Zellen/Kammer) ausgesät, über Nacht kultiviert und mit 8 % Paraformaldehyd und 200 mM HEPES, pH 7,4, fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal 10 Minuten mit 200 mM HEPES und 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach Behandlung mit 0,2 % Triton X-100 wurden die Zellen erneut gewaschen, für 30 Minuten bei 37°C mit 3 % BSA in PBS und anschließend für 5 Minuten in 0,1 % BSA in PBS blockiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in 0,1 % BSA inkubiert, daraufhin mit 0,1 % BSA gewaschen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur dunkel mit dem sekundären AF 488-gelinkten Antikörper in 0,1 % BSA inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen, in Prolong Gold, das bereits DAPI enthielt, eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

C.2.3.10. Messung der Apoptose mithilfe der Caspase 3-Aktivität

Zur Messung der Apoptose anhand der Caspase 3-Aktivität in den Cathepsin-defizienten PC-3 Zellen wurde ein Caspase 3 Assay herangezogen (Denault et al., 2007; Denault and Salvesen, 2003). Zunächst wurden die Zellen in einer 6-Wellplatte ausgesät und über Nacht inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die für 6 Stunden mit 500 nM Staurosporin behandelt wurden. Mit einem hypo-osmotischen Lysepuffer (20 mM PIPES, 20 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT frisch; pH 7,4) wurden aus den Zellen Lysate hergestellt. Dazu wurden 100 µl Lysepuffer pro Well verwendet, die Zellen mit einem Zellschaber in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis mit Ultraschall behandelt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (16.000g, 5 min, 4°C) und die Überstände in ein neues Eppendorfgefäß überführt. In eine schwarze 96-Wellplatte (Costar) wurden pro Well 50 µl 2xCaspasepuffer (20 mM PIPES, 200 mM NaCl, 20% Sucrose, 0,2% (w/v) CHAPS, 2 mM EDTA, 20 mM DTT frisch; pH 7,2) vorgelegt. Dazu kamen 20 µl Lysat und 10 µl Z-VAD-FMK als Caspaseinhibitor bzw. E64 als Cysteinproteaseinhibitor bzw. H₂O. Für den Leerwert wurden 50 µl Wasser und für die Hintergrundkontrolle 30 µl Wasser und 20 µl Substrat benutzt. Die Platte und die Substratlösung Ac-DEVD-AFC (100 µM) wurden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 20 µl Substrat in jedes Well (Ausnahme: Leerwert) hinzupipettiert und die Platte dann sofort im Fluorimeter für 30 Minuten kontinuierlich gemessen (λ (Exzitation) = 405 nm und λ (Emission) = 500 nm). Bei der Auswertung wurde die gemessene

Fluoreszenzintensität auf die mit dem BCA-Assay bestimmte Proteinmenge der Lysate normalisiert.

C.2.3.11. Cathepsin-Aktivitätsmessung

Als Kontrolle für die Wirkung der Cysteinproteaseinhibitoren wurde die Aktivität von Cathepsinen enzymkinetisch gemessen. Zunächst wurden die PC3-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach 6 Stunden mit 1, 10, 20, 50 und 100 μM E-64 (nicht-zellgängiger Cysteinproteaseinhibitor) und E-64d (zellgängige Variante von E-64) behandelt. CA-074 (nicht-zellgängiger Cathepsin B-spezifischer Inhibitor) und CA-074-Me (zellgängige Variante von CA-074) wurden in den Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 50 μM eingesetzt. LNCaP-Zellen wurden mit 5, 10, 50 μM E-64 und CA-074 versetzt, während die Konzentrationen von E-64d und CA-074-Me 1, 5, 10 und 50 μM betrugen, da davon ausgegangen wurde, dass die zellgängigen Inhibitoren eine stärkere Wirkung zeigen würden. Die Konzentrationen der Inhibitoren bei LNCaP-Zellen wurden etwas niedriger gewählt als in den PC3-Zellen, da sie Cathepsine nicht so stark überexprimieren wie PC3-Zellen. Die Kontrollzellen wurden mit 1% DMSO behandelt, was der Menge entsprach, in der die höchste Konzentration der Cysteinproteaseinhibitoren gelöst war. Nach 24 Stunden Inkubation wurden mit einem nicht-denaturierenden Protein-Lysispuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 6,0) Zelllysate hergestellt, auf Eis mit Ultraschall behandelt und Zelltrümmer abzentrifugiert. Für den Assay wurden in eine 96-Wellplatte 100 μl 2xPhosphat-Puffer (100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,4 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 6,0, mit 4 mM DTT und 4% DMSO), 70 μl Aqua dest. und 10 μl Zelllysate pipettiert. Dann wurden 25 μM des Cathepsinsubstrats Z-Phe-Arg-AMC hinzugefügt und die Substratumsetzung für 10 Minuten in einem Fluoreszenzreader bei $\lambda = 440 \text{ nm}$ gemessen.

C.2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde aus den Mittelwerten und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. Bei 2 zu vergleichenden Gruppen wurde der Student's T-Test verwendet, bei 3 oder mehr Gruppen die einfache Varianzanalyse (One-way ANOVA). Wenn bei 3 oder mehr Gruppen 2 unbekannte Variablen zu testen waren, wurde die zweifache Varianzanalyse (Two-way ANOVA) benutzt. Als statistisch signifikant wurden P-Werte angesehen, die kleiner als 0,05 (*), 0,01 (**) bzw. 0,001 (***) waren. Wenn nicht anders vermerkt,

wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

D. Ergebnisse

D.1. siRNA-vermittelte Downregulation von Cathepsinen in Prostatakrebszellen

Für die Untersuchung der Einflüsse lysosomaler Cysteinproteasen auf Seneszenz, Proliferation, Apoptosemechanismen und proliferative Signalwege in Prostatakrebszellen wurden in den beiden Prostatakarzinomzellreihen PC-3 und LNCaP die Cathepsine X, B, L und K einzeln durch eine transiente siRNA-Transfektion herunterreguliert. Beide sind gut etablierte Prostatakarzinomzelllinien, die aus unterschiedlichen Geweben isoliert wurden: während PC3-Zellen aus der Knochenmetastase eines menschlichen Spenders gewonnen wurden, stammten LNCaP-Zellen aus einer Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms. Die Cathepsin-defizienten Zellen wurden dann bezüglich ihrer Proliferation, Apoptose und Signaltransduktion mit Kontrollzellen verglichen, welche mit einer siRNA transfiziert worden waren, für die im humanen Genom keine Zielsequenz existiert. Die gewählte Methode der Transfektion war Lipofektion mit dem HiPerFect-Reagenz. Um zu kontrollieren, ob die siRNAs durch das Lipofektionsreagenz effizient in die Zellen eingeschleust wurden, wurden Zellen mit AF-488-markierter siRNA transfiziert und die Lokalisation der siRNAs im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Dabei waren stets mind. 80% der Zellen transfiziert, wobei die PC3-Zellen stärker transfiziert waren als die LNCaP-Zellen (Abb. D.1).

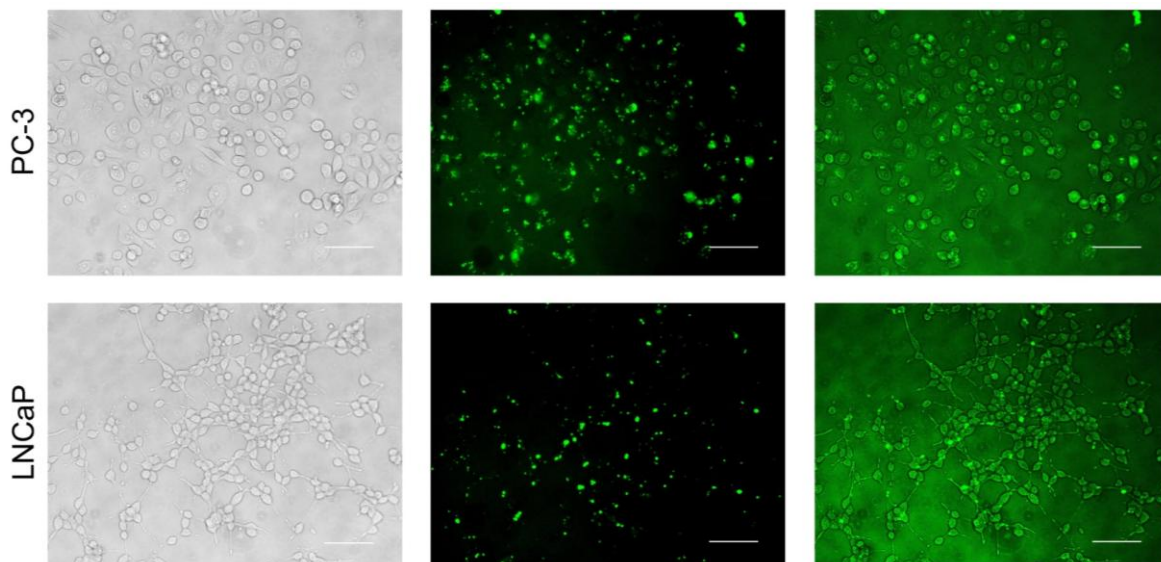


Abb. D.1: Transfektion von Prostatakarzinomzellen mit einer fluoreszierenden siRNA. Die Zellen wurden mit einer non-silencing-siRNA transfiziert, an die der grün-fluoreszente Farbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt war. Die Bilder wurden 18 Stunden nach der Transfektion bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Links: Phasenkontrast, Mitte: GFP, rechts: Überlagerung. Der Größenstandard beträgt 100 µm.

Die Effizienz der siRNA-vermittelten Downregulation der Cathepsine wurde auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR überprüft (Abb. D.2). Hierbei konnte stets ein Knockdown von 70 – 90% für jedes der vier Cathepsine nachgewiesen werden. Auf Proteinebene wurde der Knockdown mithilfe von Immunoblots für Cathepsin X und ELISA für die Cathepsine B und L getestet. Dabei war die Cathepsin X-Proteinmenge in den mit Cathepsin X-siRNA-transfizierten Prostatakarzinomzellen um 70 – 80% herabgesetzt. Die Downregulation der Cathepsine B und L wurde mithilfe eines ELISA nachgeprüft, wobei Cathepsin B um ca. 75 % reduziert war und Cathepsin L in den entsprechenden Knockdownzellen nicht mehr zu detektieren war. Nach den anfänglichen Versuchen wurde deutlich, dass Cathepsin K in beiden Zelllinien zwar exprimiert war, jedoch in den LNCaP-Zellen schwächer als in den PC3-Zellen, da Cathepsin K bevorzugt in Knochenmetastasen von Prostatakarzinomen heraufreguliert wird. Dies erschwerte seine Herabregulation auf mRNA-Ebene in LNCaP-Zellen, weshalb die Gruppe der Cathepsin K-defizienten Prostatakarzinomzellen nicht bei allen Experimenten ausgewertet werden konnte.

Sofern alle Bedingungen gleich blieben, war der Knockdown stets sehr effizient. Es fiel jedoch auf, dass bei der Verwendung des fetalen Kälberserum (FCS) der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, statt des sonst stets verwendeten FCS Gold der Firma PAA, Linz, Österreich, die Knockdown-Effizienz mit durchschnittlich ca. 50 % deutlich geringer ausfiel. Es bleibt fraglich, woran dieser große Unterschied genau liegen könnte, jedoch scheinen die Inhaltsstoffe des FCS eine wichtigere Rolle für die RNA-Interferenz zu spielen, als bisher vermutet.

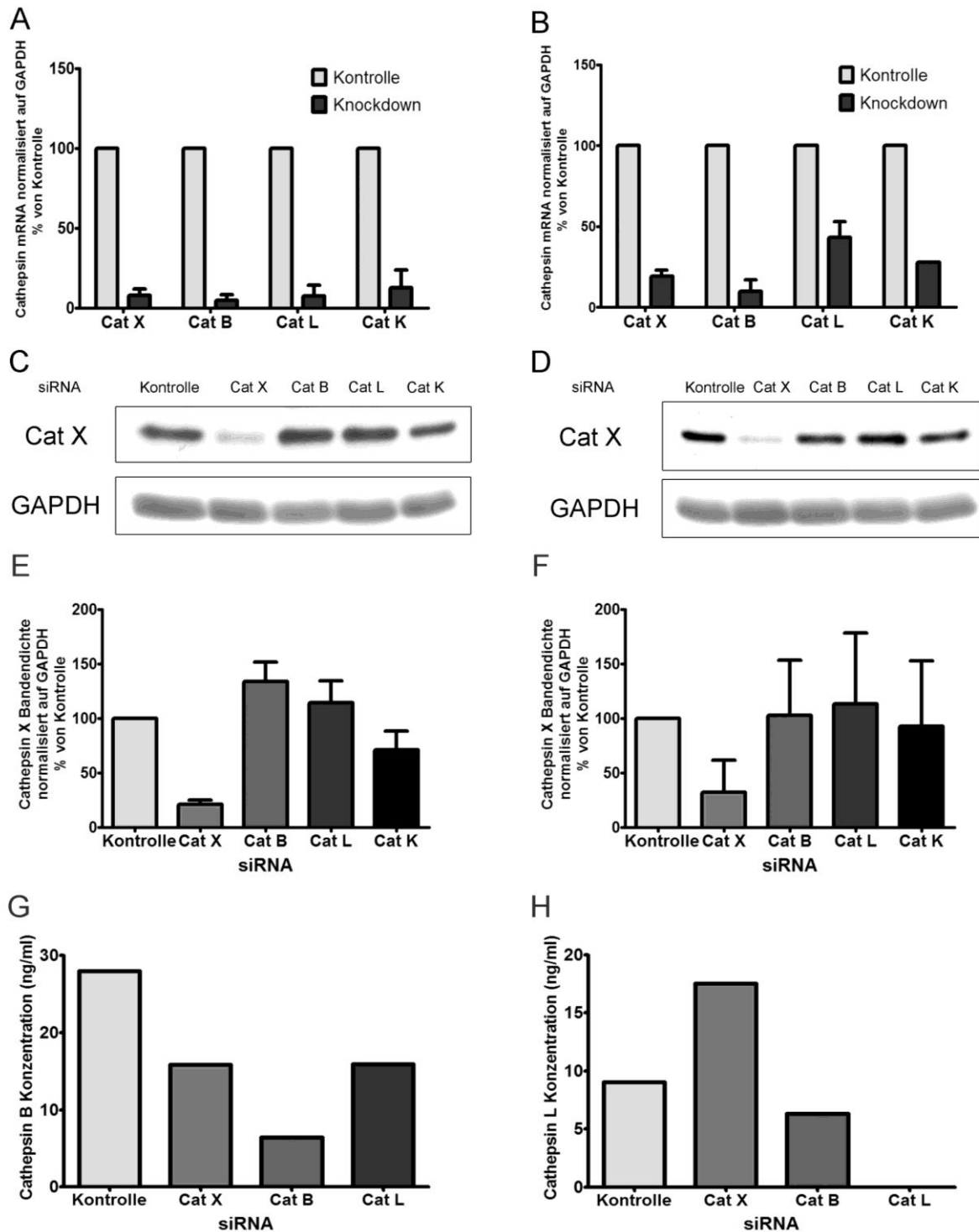


Abb. D.2: Effizienz des Knockdown in Prostatakarzinomzellen. Die Downregulation der Cathepsine wurde mithilfe quantitativer PCR (A, B), Immunoblot (C, D) und ELISA (G, H) nachgewiesen. A, C, E, G und H: PC3-Zellen, B, D und F: LNCaP-Zellen. Der Knockdown von Cathepsin K in LNCaP-Zellen wurde nur einmal durchgeführt, sonst wurden für den Nachweis auf RNA-Ebene stets cDNAs aus jeweils 3 verschiedenen Transfektionen verwendet. E und F stellen die densitometrische Auswertung von jeweils 4 Immunoblots mit Cathepsin X dar, wobei Cathepsin X stets auf GAPDH normiert wurde. G und H zeigen die Ergebnisse der ELISAs, die nur einmal in PC3-Zellen durchgeführt wurden (G: Cathepsin B-ELISA, H: Cathepsin L-ELISA).

D.1.1. Proliferation der Prostatakarzinomzellen

Die Proliferation der Prostatakrebszellen wurde mithilfe des BrdU ELISA bestimmt, welcher die Inkorporation des Basenanalogs Bromodeoxyuridin in die DNA der Zellen während der DNA-Synthese-Phase des Zellzyklus innerhalb von 2 Stunden misst und dadurch das Ausmaß der Zellvermehrung in diesem Zeitraum darstellt. Da bei Fibroblasten Cathepsin X-Defizienz mit einer verminderten Proliferationsrate einherging, wurde vermutet, dass Cathepsine die Proliferation der Tumorzellen fördern und deshalb auch Prostatakarzinomzellen bei verminderter Expression der Cathepsine X, B, L oder K weniger proliferieren würden.

In den BrdU-Assays war jedoch kein eindeutiger Unterschied in der Proliferation zwischen den Cathepsin-defizienten Zellen und den Kontrollzellen zu erkennen (Abb. D.3). In beiden Zelllinien ist die Zellproliferation nach Downregulation von Cathepsin B von allen Cathepsin-defizienten Zellen am geringsten, doch im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht signifikant verringert. Auch eine Stimulation mit den Wachstumsfaktoren IGF-I oder IGF-II nach vorangegangenem Hungern konnte die Proliferation der Cathepsin-defizienten PC3-Zellen nicht steigern.

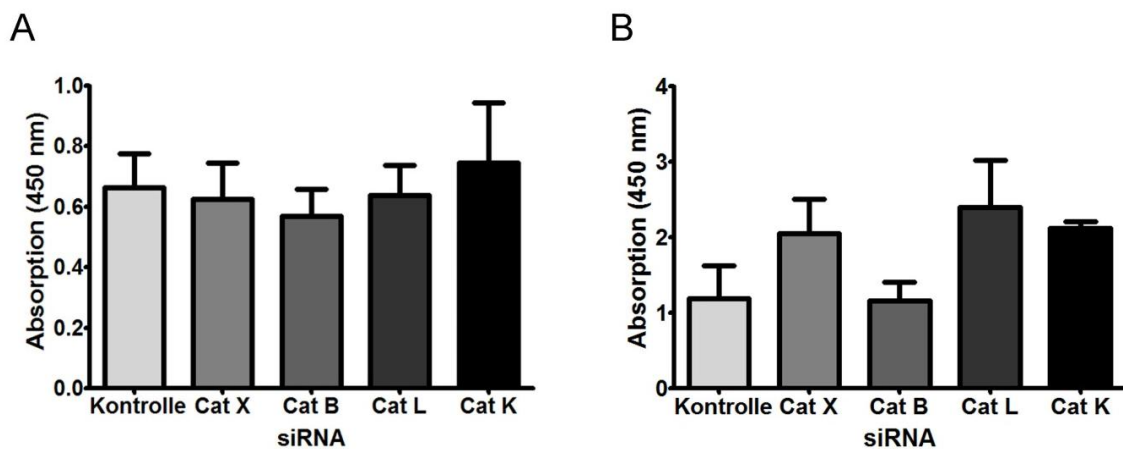


Abb. D.3: Einfluss der Cathepsin-Defizienz auf Proliferation (BrdU ELISA). Die Proliferation der Prostatakarzinomzellen wurde 3 Tage nach Transfektion mithilfe des BrdU-Assays bestimmt. Es wurden die Ergebnisse aus je 3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Proliferationsraten der Cathepsin-defizienten Zellen sind teilweise erhöht, teilweise erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollzellen, es besteht jedoch keine statistische Signifikanz. A: PC3-Zellen, B: LNCaP-Zellen.

D.1.2. Zelluläre Seneszenz der Prostatakarzinomzellen

Die Herabregulation von Cathepsin X führte bei vorangegangenen Experimenten in Fibroblasten zu zellulärer Seneszenz der Zellen, einer Zellalterung, bei der der Zellzyklus verlangsamt abläuft. Dies wurde anhand mehrerer Faktoren bestätigt. Die Fibroblasten wiesen nach siRNA-induzierter Downregulation von Cathepsin X die typische seneszente Morphologie auf: sie waren vergrößert und abgeflacht und vermehrten sich kaum noch. Außerdem zeigten sie eine verstärkte Expression von Seneszenzgenen wie den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p16 (INK4a) und p21 (CIP1/WAF1), Caveolin und p53.

In beiden Prostatakarzinomzelllinien jedoch erfolgte nach dem Knockdown der Cathepsine X, B, L oder K kein Anstieg der Seneszenzmarker p16 und p21 (Abb. D.4). Die Cathepsin-defizienten Zellen erschienen auch in ihrer Morphologie nicht verändert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Lediglich p53 war in Cathepsin X und K-defizienten PC3-Zellen auf RNA-Ebene erhöht. Das Protein besitzt jedoch als Tumorsuppressor sehr viele wichtige Funktionen, nicht nur bei zellulärer Seneszenz, sondern auch bei der Regulation von Apoptose.

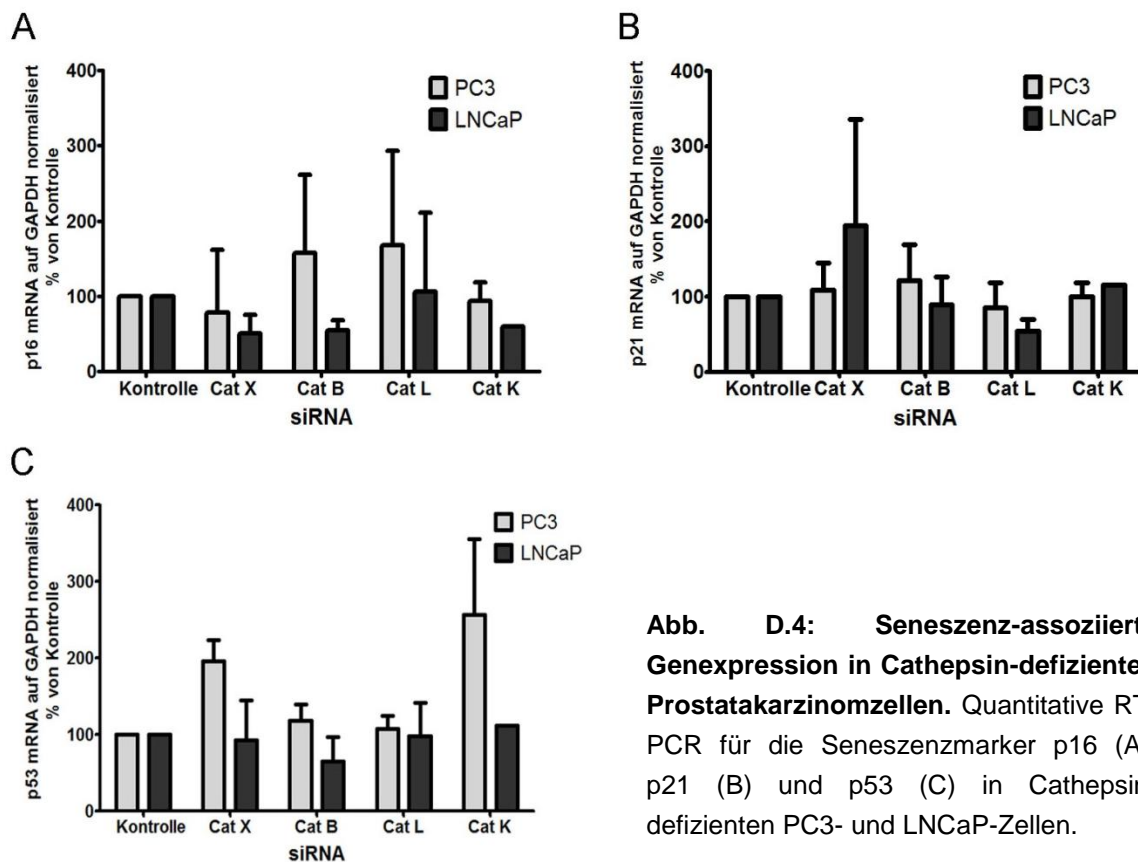


Abb. D.4: Seneszenz-assoziierte Genexpression in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen. Quantitative RT-PCR für die Seneszenzmarker p16 (A), p21 (B) und p53 (C) in Cathepsin-defizienten PC3- und LNCaP-Zellen.

D.1.3. Apoptose in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen

D.1.3.1. Expression der Apoptoseproteine Bax, Bid und Bcl-2

Statt einer Veränderung der Zellmorphologie hin zu einem seneszenten Phänotyp fiel bei Betrachtung der Cathepsin-defizienten PC3-Zellen in der Zellkultur auf, dass es im Vergleich zu den Kontrollzellen eine erhöhte Anzahl toter Zellen gab. Deshalb wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um Apoptose und Apoptosemoleküle zu untersuchen und die aufgestellte Hypothese zu bestätigen, dass Cathepsin-Defizienz in Prostatakarzinomzellen zu einer erhöhten Apoptoserate führt.

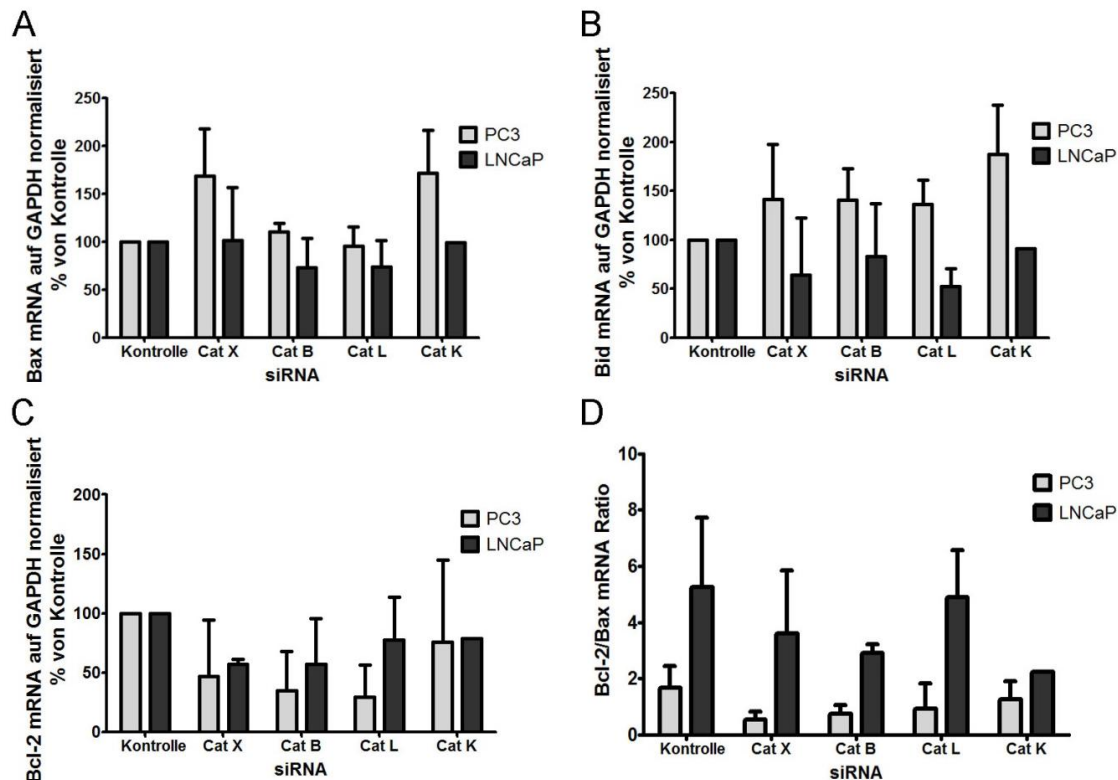


Abb. D.5: Apoptose-assoziierte Genexpression in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen. Mittels quantitativer PCR wurde die Expression der Gene Bax, Bid und Bcl-2 mit cDNA-Proben aus je 3 siRNA-Transfektionen pro Zelllinie gemessen (außer bei Cat K-defizienten LNCaP). Bei Cathepsin K-defizienten LNCaP-Zellen wurde nur eine cDNA verwendet. Zur Ermittlung der Bcl-2/Bax-Ratio wurden die Kopienzahlen von Bcl-2 durch jene von Bax geteilt.

Zunächst wurde die Expression der Proteine der Bcl-2-Familie in den Prostatakrebszellen gemessen.

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind hauptsächlich am intrinsischen Pfad zur Apoptoseauslösung beteiligt und wirken entweder pro- oder anti-apoptotisch, indem sie die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran fördern oder hemmen. Die Permeabilisierung der Membran führt zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien, wodurch die Apoptose bewirkt wird.

Hier wurden sowohl pro-apoptotische Proteine wie Bax und Bid, als auch das anti-apoptotische Protein Bcl-2 untersucht (Abb. D.5). Die Expression auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht, während die Expression auf Protein-Ebene im Immunoblot nachgewiesen wurde. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine reduzierte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in den Cathepsin-defizienten PC3- und LNCaP-Zellen. Die beiden pro-apoptotischen Proteine Bid und Bax waren auf mRNA-Ebene lediglich in PC3-Zellen, die mit siRNA gegen die Cathepsine X, B und K transfiziert worden waren, verstärkt exprimiert, wobei sich jedoch keine statistische Signifikanz der Ergebnisse nachweisen ließ.

Insgesamt war die Bcl-2/Bax-Ratio nach Knockdown aller Cathepsine in den Prostatakarzinomzellen beider Zelllinien erniedrigt, dabei am stärksten nach Downregulation von Cathepsin X und B. Diese Reduktion der Ratio aus dem anti-apoptotischen Bcl-2 und pro-apoptotischen Bax ist ein Hinweis darauf, dass nach Cathepsin-Defizienz in Prostatakarzinomzellen eine Konstellation besteht, die eine Auslösung von Apoptose begünstigt.

Auf Proteinebene stellte sich das pro-apoptotische Protein Bid in allen Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen verstärkt exprimiert dar (Abb. D.6). Dabei war interessanterweise nicht nur das gesamte Protein von 22 kDa erhöht, sondern es fiel auf, dass zudem tBid (15 kDa) verstärkt exprimiert war. Truncated Bid (tBid) ist ein Fragment von Gesamt-Bid, das bei der Spaltung des Proteins beispielsweise durch Caspasen oder Cathepsin L entsteht, und zeichnet sich dadurch aus, dass es eine deutlich stärkere pro-apoptotische Aktivität besitzt als Gesamt-Bid.

Gesamt-Bid war insgesamt in allen Cathepsin-defizienten PC3-Zellen und in den Cathepsin B und L-defizienten LNCaP-Zellen um ca. 50% verstärkt exprimiert. Der Anteil von tBid an Gesamt-Bid war in Cathepsin X-defizienten PC3-Zellen um ca. 50% erhöht und in allen Cathepsin-defizienten LNCaP-Zellen im Vergleich zur Kontrolle sogar verdoppelt. Die Ergebnisse wiesen keine statistische Signifikanz auf. Das pro-apoptotische Bax und das anti-apoptotische Bcl-xL waren in ihrer Expression auf Proteinebene – im Immunoblot – jedoch nicht verändert.

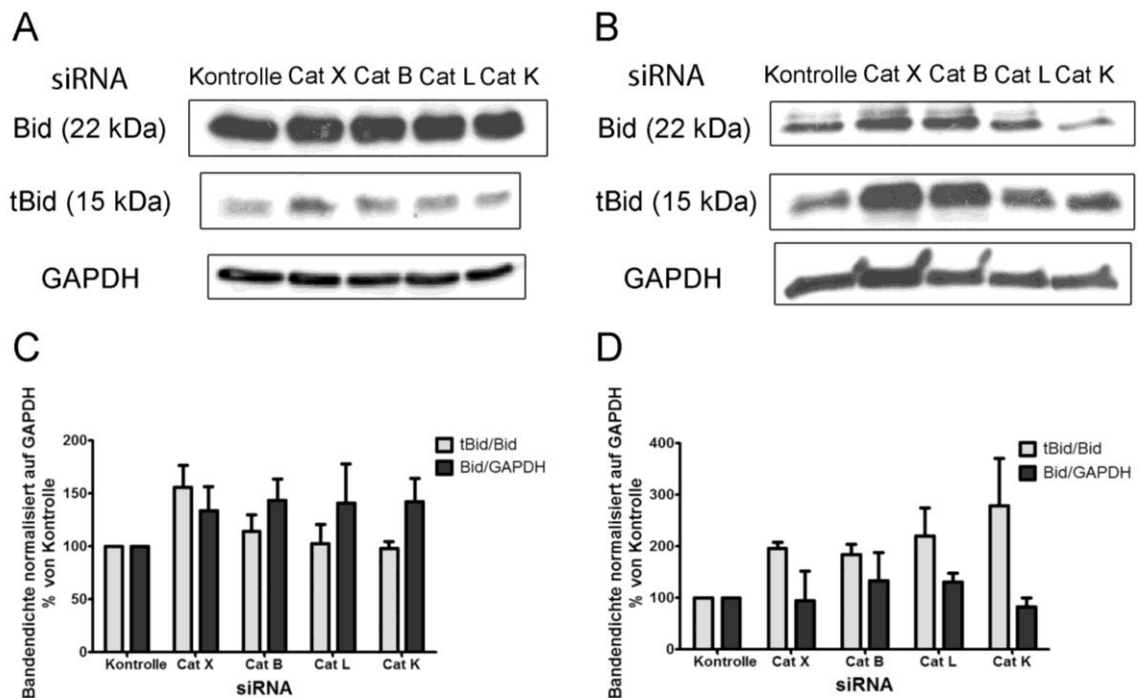
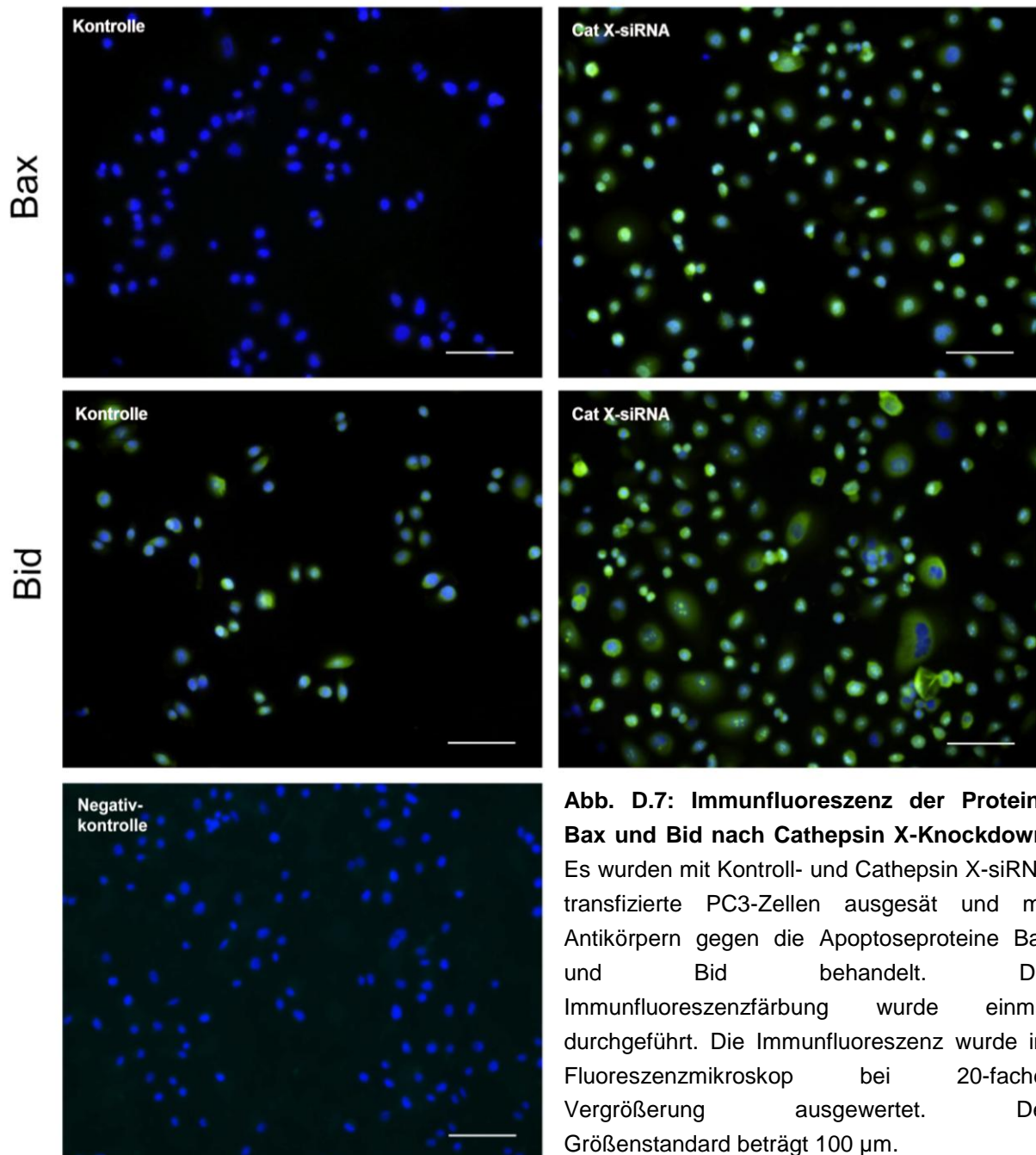


Abb. D.6: Erhöhte Expression des pro-apoptotischen Proteins Bid und tBid in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen. A und B: Immunoblot für Bid und tBid mit Cathepsin-defizienten Zelllysaten (A: PC3, B: LNCaP). C und D: Graphische Darstellung der Bandendichten aus 2 unterschiedlichen Experimenten (C: PC3, D: LNCaP).

Bei der Untersuchung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bid wurde zudem an Cathepsin X-defizienten PC3-Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei zeigten sich Bid und Bax ebenfalls in mit Cathepsin X-siRNA behandelten PC3-Zellen deutlich stärker exprimiert als in den non-silencing Kontrollzellen, der Unterschied war bei Bax größer als bei Bid (Abb. D.7).



D.1.3.2. Annexin V-Färbung zur Apoptosemessung

Die Apoptoserate der Prostatakarzinomzellen wurde zunächst mit dem „Apoptotic/necrotic/healthy cell detection kit“ von Promokine bestimmt. Dabei wurden lebende PC3-Zellen, die mit Cathepsin- bzw. non-silencing-siRNAs transfiziert worden waren, mit dem Farbstoff Hoechst 33342 blau, apoptotische Zellen durch Annexin V grün und nekrotische Zellen mittels Ethidium Homodimer III rot angefärbt.

Hier zeigte sich eine Tendenz zu vermehrter Apoptose in allen Cathepsin-defizienten PC3-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. D.8).

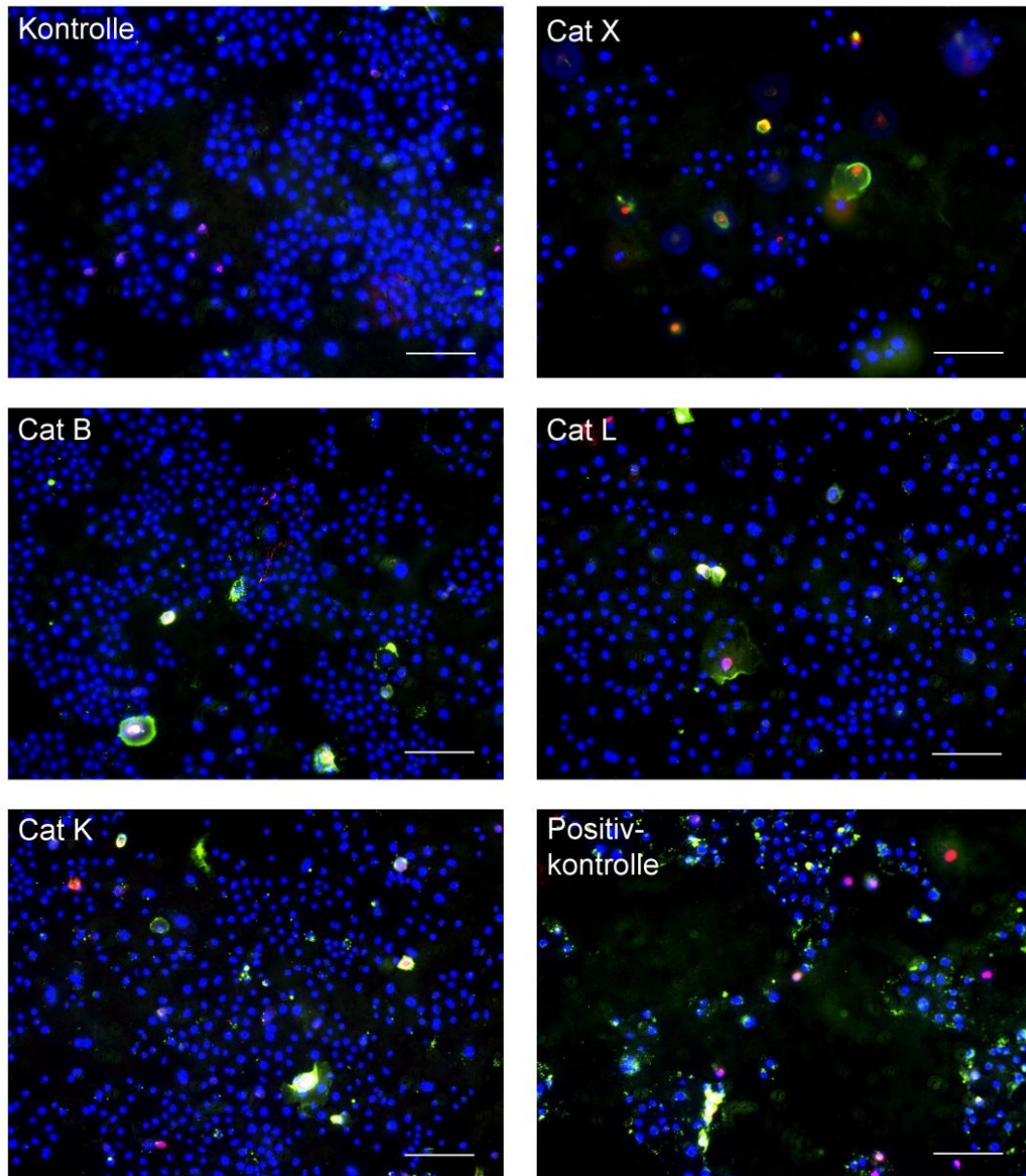
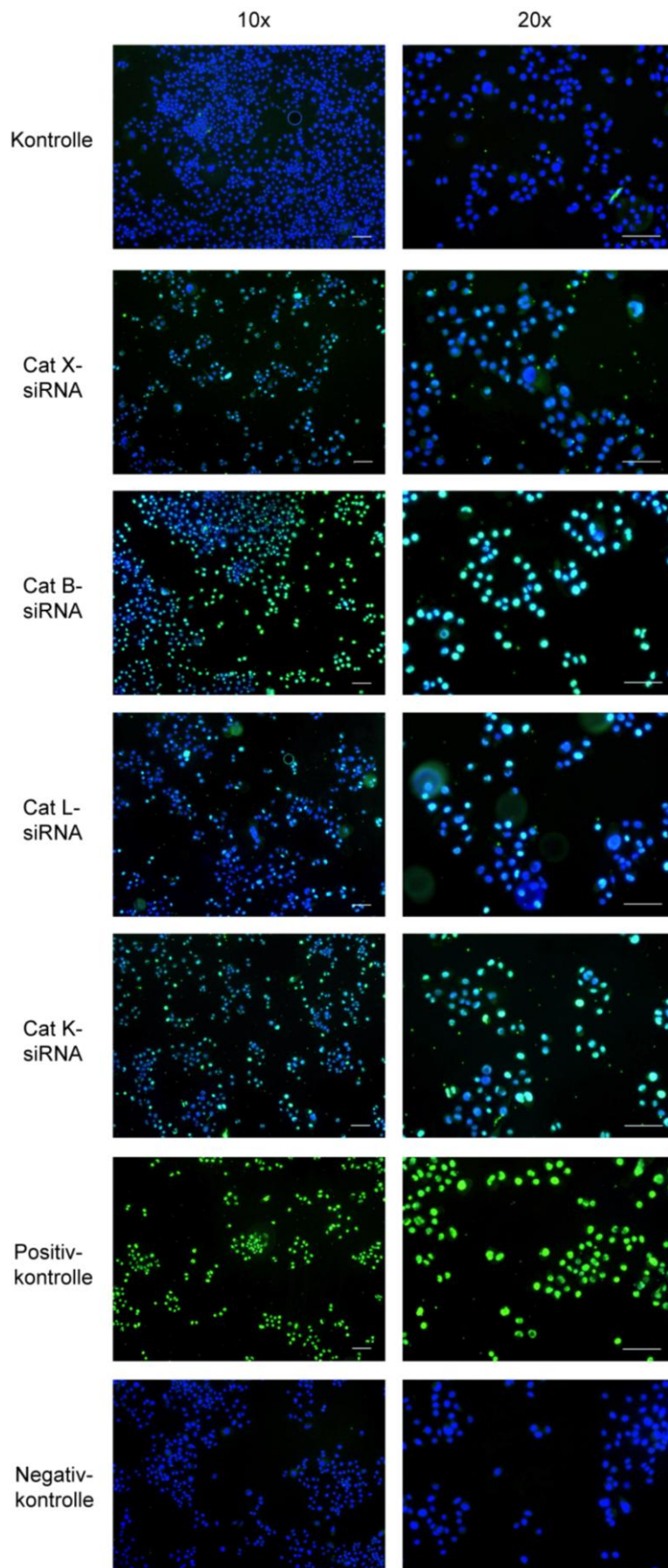


Abb. D.8: Annexin V-Färbung von Cathepsin-defizienten PC3-Zellen. Die Cathepsin-defizienten PC3-Zellen wurden mit den Farbstoffen Hoechst 33342 (blau, Zellkerne), Annexin V (grün, apoptotische Zellen) und Ethidium Homodimer III (rot, nekrotische Zellen) inkubiert. Für die Positivkontrolle wurden Kontrollzellen 6 Stunden vor dem Versuch mit 500 nM Staurosporin zur Apoptoseinduktion behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der Größenstandard entspricht 200 μm . Die Aufnahmen erfolgten bei 10xVergrößerung.

D.1.3.3. TUNEL-Assay



Als zweiter Apoptose-Assay und Gold-Standard der Apoptosedetektion wurde der TUNEL-Assay durchgeführt (Abb. D.9). Bei diesem werden mithilfe der terminalen Deoxynukleotidyltransferase (TdT) gelabelte Nukleotidanaloga an die Strangbrüche der Zell-DNA angebracht und detektiert.

Abb. D.9: TUNEL-Assay in Cathepsin-defizienten PC3-Zellen. Der TUNEL-Assay wurde mit siRNA-transfizierten PC3-Zellen durchgeführt. Non-silencing-Zellen wurden als Negativkontrolle und Positivkontrolle verwendet. Die Positivkontrolle wurde mit DNase behandelt. Die apoptotischen Zellen aus 6 Gesichtsfeldern wurden gezählt, auf die gesamte Zellzahl hochgerechnet und die Mittelwerte gebildet. Das Experiment wurde so insgesamt zweimal durchgeführt, wobei dieses nun stellvertretend gezeigt wird. Links sind Bilder in 10-facher Vergrößerung zu sehen, rechts in 20-facher Vergrößerung. Der Größenstandard entspricht 100 μm .

Bei der Auslösung von Apoptose wird die DNA der Zellen abgebaut, weshalb apoptotische Zellen viele Strangbrüche aufweisen und deshalb in diesem Assay eine grüne Fluoreszenz zeigen. Hier war ein starker Anstieg der Apoptoserate in den Cathepsin-defizienten PC3-Zellen erkennbar, der jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. Bei Downregulation der Cathepsine B und L war die Apoptoserate das 4-5-fache der Kontrolle. Bei Defizienz der Cathepsine X und K war der Unterschied sogar ungefähr das 10-fache, doch die Experimente waren größeren Schwankungen ausgesetzt (Abb. D.10).

Bei den LNCaP-Zellen zeigte sich die gleiche Tendenz, dass in den Cathepsin-defizienten Zellen eine erhöhte Apoptoserate vorlag. Hier war besonders die Downregulation von Cathepsin X und B die Apoptoserate 4-5-mal so hoch wie die der Kontrolle.

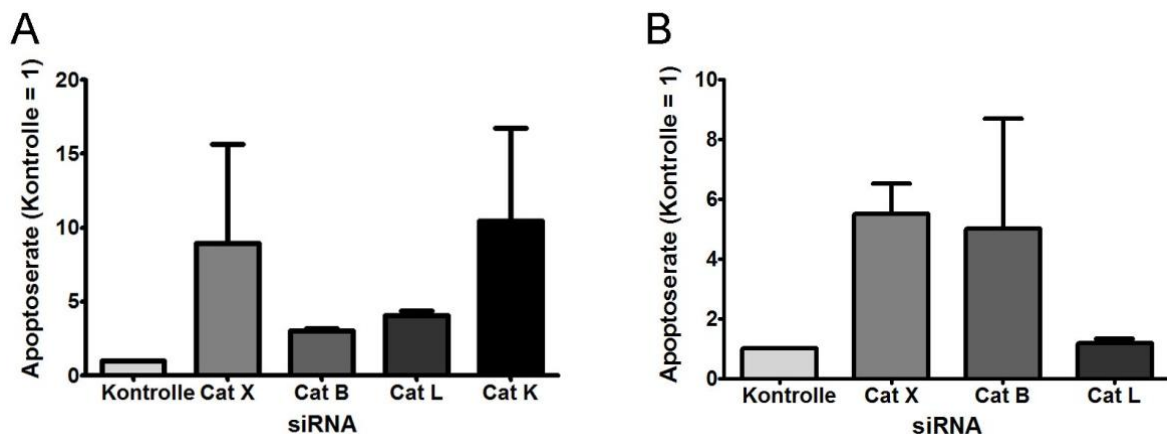


Abb. D.10: Erhöhte Apoptoserate in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen. Der TUNEL-Assay wurde mit PC3- und LNCaP-Zellen durchgeführt, die mit siRNAs gegen Cathepsin X, B, L und K und Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus zwei Experimenten, wobei pro Experiment 6 Gesichtsfelder nach apoptotischen Zellen im Vergleich zur gesamten Zellzahl ausgezählt worden waren. Die aus dem Quotienten der apoptotischen Zellen pro Gesamtzellzahl bestimmte Apoptoserate wurde relativ zur Kontrolle (=1) dargestellt. A: PC3, B: LNCaP

D.1.3.4. Messung der Apoptose über die Caspase 3-Aktivität

Ein weiteres Experiment zur Untersuchung von Apoptose und deren Auslösung war die Messung der Caspaseaktivität in verschiedenen Zelllysaten. Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Pfad zur Apoptose werden von Initiator- oder Effektorcaspasen geregelt, die sich kaskadenartig gegenseitig aktivieren und die Apoptose der Zellen einleiten. Deshalb ist es interessant, zu beobachten, ob die

Caspaseaktivität bei Zellen mit Cathepsindefizienz von der der Kontrollzellen abweicht.

Dazu wurde das Caspase-spezifische Substrat Ac-DEVD-AMC verwendet, um die Caspaseaktivität zu messen. Mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK wurde kontrolliert, ob die gemessene Aktivität Caspase-spezifisch inhibiert werden konnte. Da der Caspaseinhibitor die Aktivität nicht sehr stark senken konnte und eine hohe Restaktivität herrschte, wurde lediglich die Differenz der Aktivität mit und ohne Inhibitor berechnet und als Caspaseaktivität ausgewertet (Abb. D.11, B). Hierbei war die Caspaseaktivität in Cathepsin X und L-defizienten PC3-Zellen um ca. 30 % erhöht im Vergleich zu den Kontrolllysaten, jedoch nicht bei den Cathepsinen B und K. Die Positivkontrolle, die durch Inkubation von Kontrollzellen mit dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporin entstand, wies die dreifach erhöhte Caspaseaktivität auf.

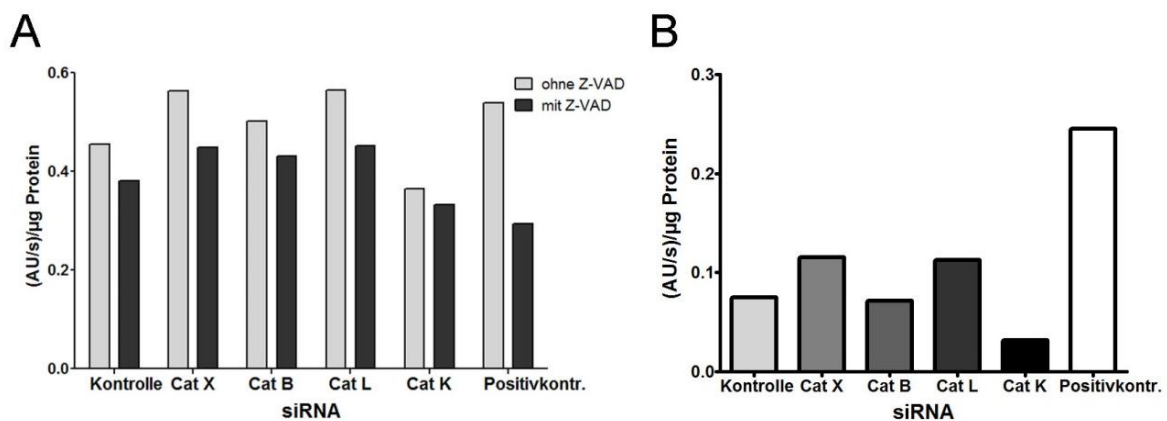


Abb. D.11: Caspase-Aktivität in Cathepsin-defizienten PC-3. A: Es wurde in einem Experiment die Caspaseaktivität mit dem Substrat Ac-DEVD-AMC in PC3-Zelllysaten gemessen, die mit siRNA gegen Cathepsine X, B, L und K transfiziert worden waren, - mit und ohne dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK. B: Die Differenz aus den Aktivitätswerten ohne und mit Z-VAD-FMK wurde berechnet, die der realen Caspaseaktivität entspricht. Das Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

D.1.4. Untersuchung des IGF-Signalwegs

Da der IGF-Signalweg für die Tumorprogression sehr viele wichtige Funktionen ausübt, wurde er in Prostatakarzinomzellen mit Downregulation von Cathepsinen genauer untersucht. Es wurde bereits in früheren Experimenten gezeigt, dass Cathepsin X-defiziente Prostatakarzinomzellen eine Hochregulation des gesamten IGF-IR auf mRNA- und Proteinebene aufweisen.

Der IGF-IR war hier auf mRNA-Ebene lediglich in Cathepsin X-defizienten PC3-Zellen um ca. 90 % erhöht, jedoch nicht in den Zellen, in denen andere Cathepsine herabreguliert worden waren oder in LNCaP-Zellen.

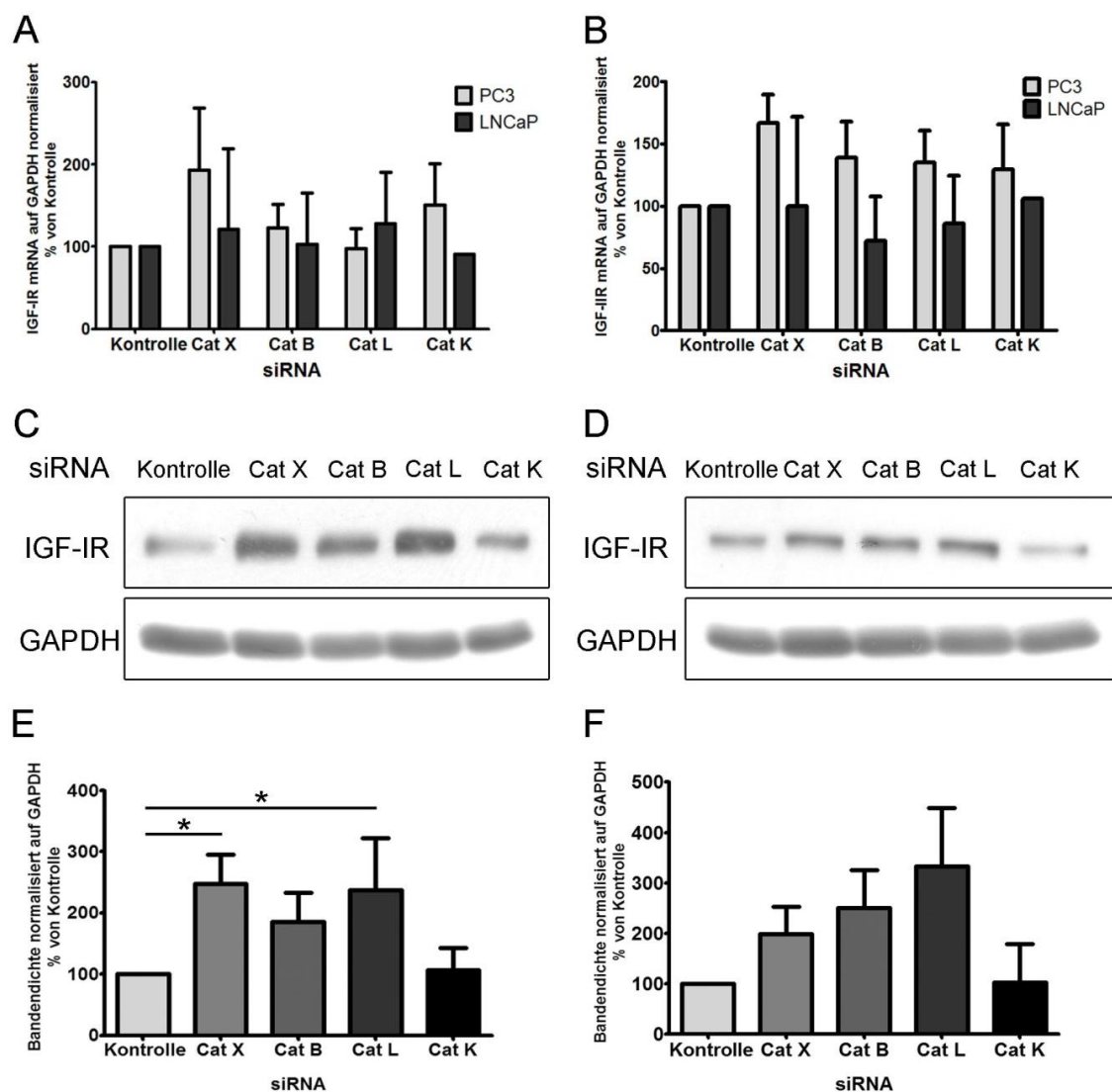


Abb. D.12: Genexpression der IGF-Rezeptoren in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen. A und B: Quantitative PCR für die mRNA von IGF-IR und IGF-IIR in Cathepsin-defizienten Zellen (A: IGF-IR, B: IGF-IIR), C und D: Immunoblot für IGF-IR (C: PC3, D: LNCaP). E und F: Densitometrische Auswertung von jeweils 3 verschiedenen Immunoblots für IGF-IR (E: PC3, F: LNCaP). Für die statistische Auswertung wurde eine einfache Varianzanalyse herangezogen. *: $p < 0,05$.

Die IGF-IIR-mRNA-Expression war in allen Cathepsin-defizienten PC3-Zellen um 30 – 60 % gesteigert, aber nicht in den LNCaP-Zellen. Die Experimente auf Proteinebene zeigten ein eindeutigeres Bild. Im Immunoblot war die Expression des IGF-IR in fast allen Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Dabei erwies sich die Steigerung der Expression in den Cathepsin X und L-defizienten PC3-Zellen auf das 2,5-fache der Kontrollzellen als statistisch signifikant. Auch Cathepsin B-defiziente PC3-Zellen und LNCaP-Zellen mit Downregulation der Cathepsine X, B oder L zeigten eine stark erhöhte IGF-IR-Expression, welche das 2 – 3-fache der Expression in den Kontrollzellen ausmachte. Lediglich bei Defizienz des Cathepsins K war die Proteinmenge unverändert in beiden Zelllinien (Abb. D.12).

Versuche zur Bestimmung der Phosphorylierung des IGF-IR mittels Immunoblot nach 20-minütiger Stimulation der Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen mit 50 ng/ml IGF-I zeigen einen leicht reduzierten Anteil des Phospho-IGF-IR am Gesamtrezeptor in den PC3-Zellen, in denen die Cathepsine X, B und L herabreguliert worden sind (Abb. D.13).

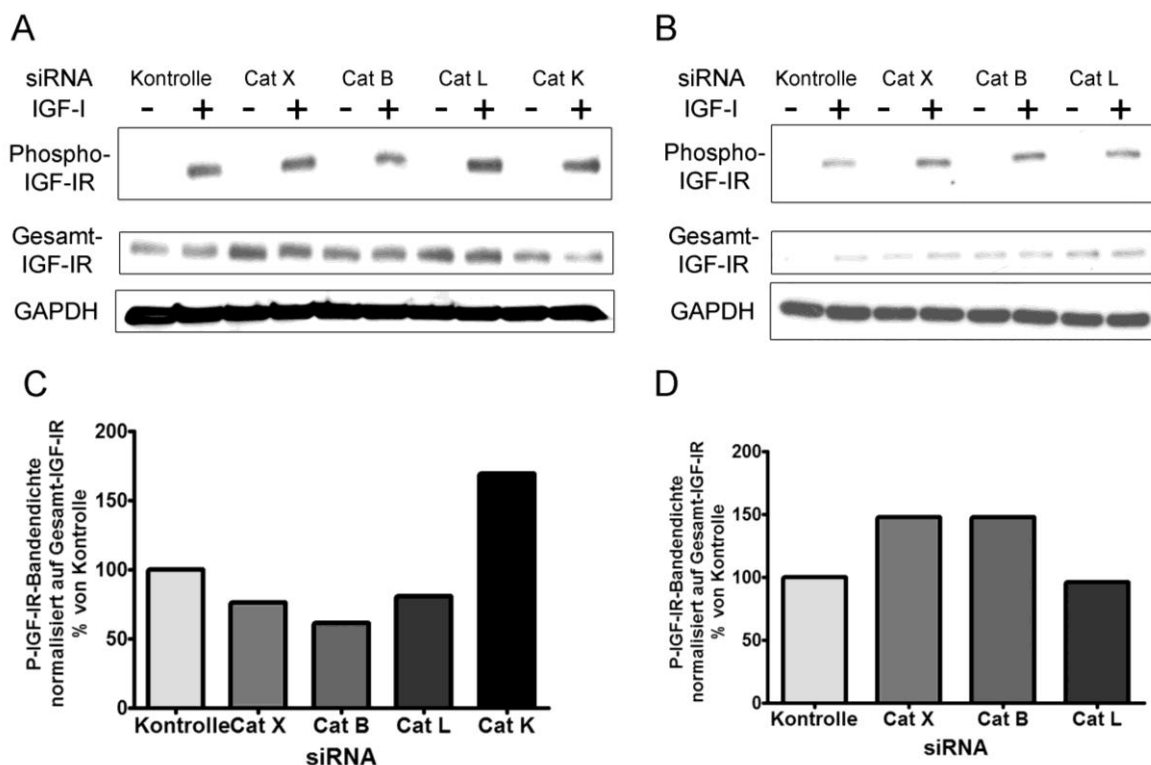


Abb. D.13: Phosphorylierung des IGF-I-Rezeptors nach Cathepsin-Knockdown. A und B: Die Cathepsin-defizienten Zellen wurden für 20 Minuten mit 50 ng/ml IGF-I stimuliert und mittels Immunoblot auf Phosphorylierung des IGF-IR getestet. C und D zeigen die densitometrische Auswertung dieser Immunoblots, wobei die Proteinmenge des Phospho-IGF-IR in den stimulierten Zellen auf den Gesamt-IGF-IR normiert und aufgetragen wurde. A&C: PC3, B&D: LNCaP.

Die Menge des Phospho-IGF-IR ist zwar nur geringfügig verändert, doch durch die Hochregulation des Gesamt Rezeptors fällt dessen Phosphorylierung geringer aus als in den Kontrollzellen. In den Cathepsin-defizienten LNCaP-Zellen und bei Downregulation von Cathepsin K ist die Phosphorylierung des IGF-IR nicht reduziert.

Zudem wurde die Aktivierung von Downstream-Molekülen des IGF-Signalwegs untersucht. Der IGF-IR aktiviert als Rezeptortyrosinkinase beispielsweise den MAPK-Signalweg, der zu Proliferation führt, doch die Phosphorylierung der Signalmoleküle ERK (extracellular signal-related kinase) – bzw. p44/42 MAPK (mitogen-activated protein kinase) – und MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) war unverändert durch Cathepsin-Defizienz. Auch das Signalmolekül AKT – bzw. Proteinkinase B –, das durch den IGF-IR und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert wird und zur Inhibition von Apoptose beiträgt, war in seiner Expression in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen nicht verändert im Vergleich zu den Kontrollzellen.

D.2. Inhibition der proteolytischen Aktivität mit Cysteinproteaseinhibitoren in Prostatakarzinomzellen

Um die Wirkungen von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen auf Proteinebene zu untersuchen, wurden PC3-Zellen und LNCaP-Zellen mit Cysteinproteaseinhibitoren behandelt. E-64 ist ein breiter nicht-membrangängiger Cysteinproteaseinhibitor, sein Derivat E-64d hingegen ist membrangängig und deshalb schon in geringeren Konzentrationen sehr effizient in der Hemmung der Cathepsinaktivität. CA-074 ist ein Cysteinproteaseinhibitor, der besonders spezifisch für Cathepsin B ist. Da auch CA-074 nicht-membrangängig ist, wurde zusätzlich die membrangängige Variante CA-074-Me verwendet.

Zu Beginn wurden die Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt und daraufhin die Cathepsinaktivität mit dem Cathepsin-spezifischen Substrat Z-Phe-Arg-AMC gemessen, um die Effizienz der Inhibitoren zu testen. In PC3-Zellen waren bei Zugabe von 1 μM E-64 80 % der Cathepsinaktivität inhibiert und ab 10 μM über 90 %, während E-64d schon bei einer Konzentration von 1 μM die Cathepsinaktivität um über 95 % senkte (Abb. D.14). Der Inhibitor CA-074 hemmte die Cathepsinaktivität in PC3-Zellen bei 1 μM um 50 % und ab 5 μM um ca. 70 %, während seine methylierte Form CA-074-Me die Cathepsinaktivität bei 1 μM um 80 % senkte und ab 5 μM um ca. 90 %. Daran ist erkennbar, dass CA-074(-Me) zwar spezifisch für Cathepsin B ist, jedoch in höheren Konzentrationen auch noch andere Cathepsine hemmen kann. In LNCaP-Zellen war die Cathepsinaktivität durch Inhibition mit E-64 schon bei einer Konzentration von 5 μM über 90 % reduziert und mit 5 μM CA-074 um 70 % gesenkt. E-64d setzte die Cathepsinaktivität in LNCaP-Zellen bei einer Konzentration von 1 μM um 80 % und ab 5 μM um über 90 % herab. Bei Behandlung mit CA-074-Me reichte schon 1 μM aus, um die Cathepsinaktivität um über 90 % zu reduzieren. Insgesamt war bei LNCaP-Zellen eine etwas geringere Konzentration der Cysteinproteaseinhibitoren nötig, um die gleiche Reduktion der Cathepsinaktivität wie bei den PC3-Zellen zu erreichen. Das liegt vermutlich daran, dass Cathepsine in LNCaP-Zellen nicht ganz so stark exprimiert sind wie in PC3-Zellen. Bei allen vier Cysteinproteaseinhibitoren wurde festgestellt, dass sie in höheren Konzentrationen (v.a. ab 50 μM) eine zytotoxische Wirkung zeigten und viele Zellen abtöteten. Deshalb wurden bei den weiteren Experimenten die niedrigsten Konzentrationen verwendet, die zu einer ausreichenden Cathepsin-Inhibition von 80-95 % führten, d.h. in PC3-Zellen für E-64 und CA-074 10 μM und für ihre membrangängigen Derivate jeweils 5 μM . In LNCaP-Zellen wurden in den weiteren Experimenten mit 5 μM E-64, 5 μM E-64d, 5 μM CA-074 und 1 μM CA-074-Me gearbeitet. In diesen Konzentrationen waren keine zytotoxischen Effekte der Cysteinproteaseinhibitoren messbar.

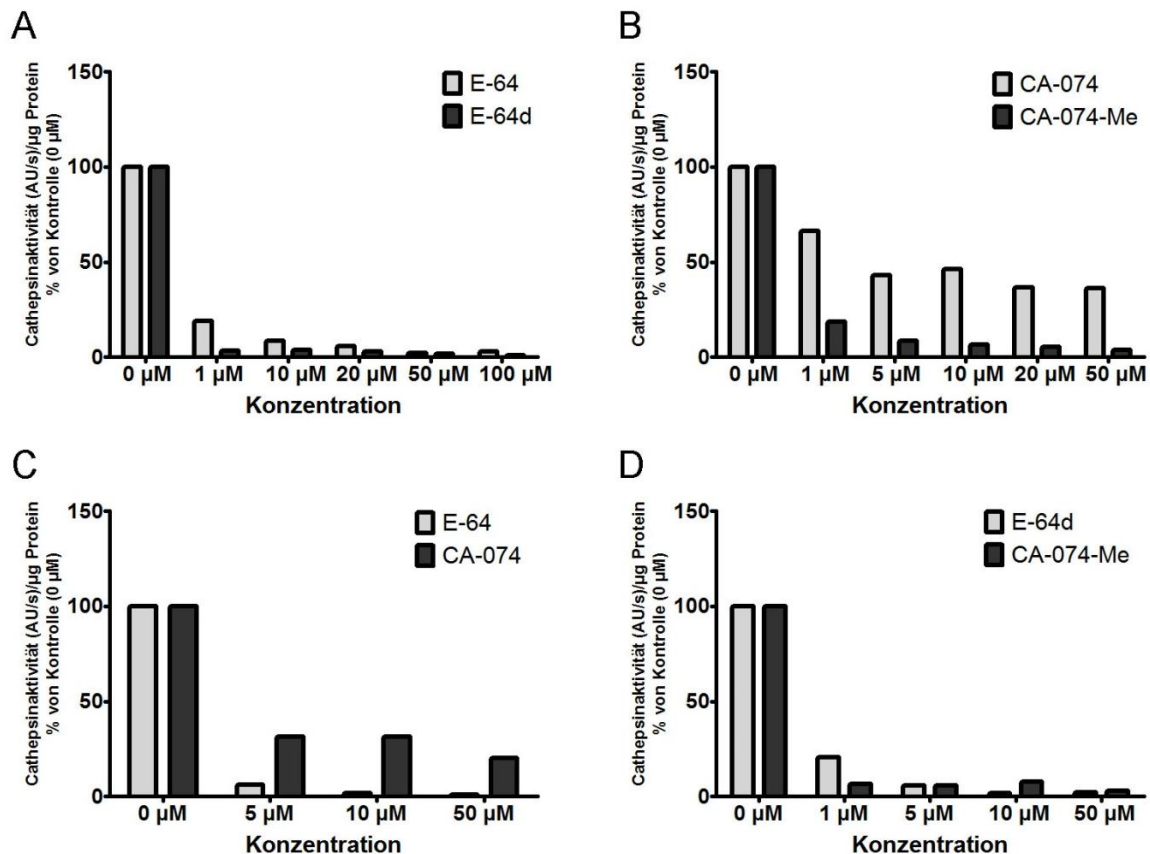


Abb. D.14: Inhibition der Cathepsin-Aktivität durch Cysteinproteaseinhibitoren. Gezeigt ist die Cathepsinaktivität nach Behandlung von PC3-Zellen (A und B) und LNCaP-Zellen (C und D) mit verschiedenen Konzentrationen der Cysteinproteaseinhibitoren E-64, E-64d, CA-074 und CA-074-Me.

D.2.1. Proliferation der Prostatakarzinomzellen

Analog zu den Versuchen mit Cathepsin-siRNA-behandelten Prostatakarzinomzellen fanden sich auch bei Inhibition der Cathepsine auf Proteinebene keine Unterschiede in der Proliferation zwischen Kontrollzellen und für 2 Tage mit Proteaseinhibitoren behandelten PC3-Zellen. Die Proliferation war dabei ebenfalls durch Inkubation mit 50 ng/ml IGF-I bzw. 200 ng/ml IGF-II für 15 Stunden nicht stimulierbar. Zunächst wurde der BrdU ELISA verwendet, bei dem die Inkorporation des Basenanalogs Bromodeoxyuridin in die DNA der Zellen während der DNA-Synthese-Phase des Zellzyklus gemessen wird und dadurch das Ausmaß der Zellvermehrung in diesem Zeitraum dargestellt wird.

Interessanterweise war nach Behandlung der PC3-Zellen für 4 Tage mit Proteaseinhibitoren im BrdU ELISA eine Reduktion der Proliferation um ca. 65 % in den CA-074-Me-behandelten Wells sichtbar, jedoch nicht bei den anderen Inhibitoren (Abb. D.15). Ebenso verhielt es sich bei den LNCaP-Zellen: auch hier war nach 4-

tägiger Behandlung mit Proteaseinhibitoren nur die Proliferation in den CA-074-Me-behandelten Zellen um ca. 75 % reduziert. Außerdem fiel auf, dass bei Aussaat der gleichen Zellzahl nach Behandlung mit CA-074-Me die Zellzahl dort nach 4 Tagen viel geringer war als in den Kontrollwells.

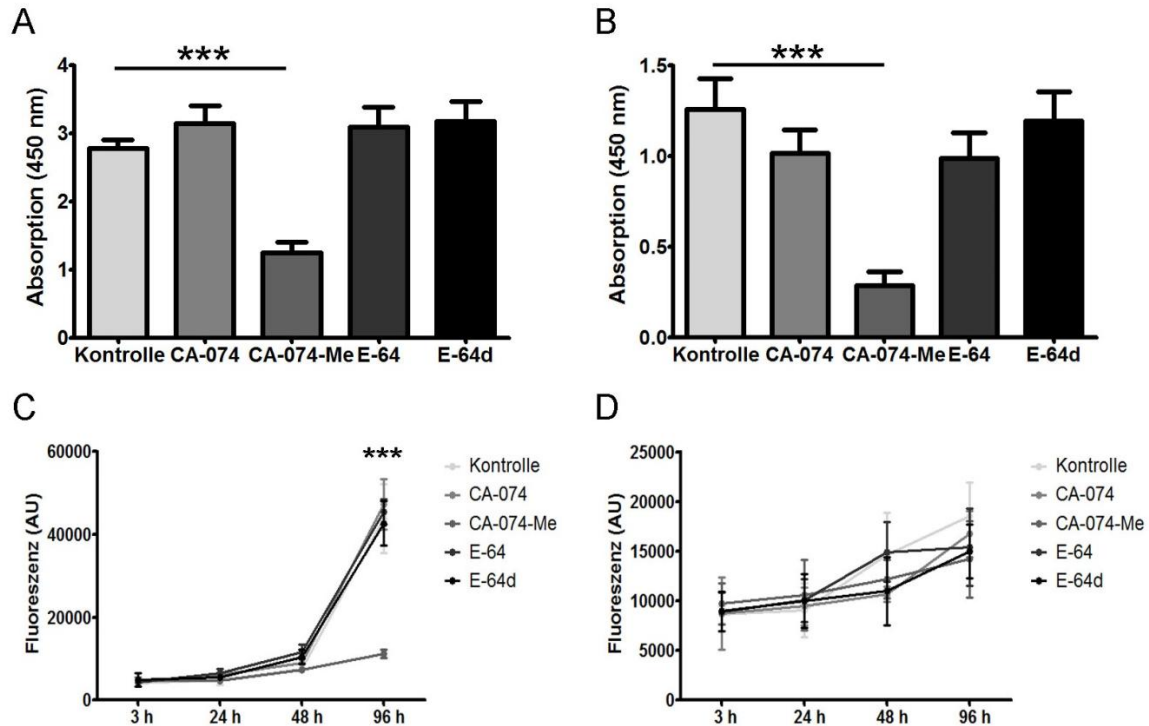


Abb. D.15: Proliferation nach Cathepsin-Inhibition in Prostatakarzinomzellen (BrdU ELISA und CyQuant Assay). A und B: BrdU ELISA von für 4 Tage mit Cysteinproteaseinhibitoren behandelten PC3-Zellen (A) und LNCaP-Zellen (B). C und D: CyQuant Assay von über 4 Tage mit Cysteinproteaseinhibitoren behandelten PC3-Zellen (C) und LNCaP-Zellen (D). Die statistische Auswertung wurde mithilfe einer einfachen Varianzanalyse (A und B) bzw. einer zweifachen Varianzanalyse (C) durchgeführt, wobei ***: $p < 0,001$.

In einem zweiten Assay wurde nochmals die Proliferation untersucht. Statt der Messung der Inkorporation des Basenanalogs Bromdesoxyuridin in die DNA der proliferierenden Zellen wurde die Interkalation des CyQuant-Reagenz in die DNA gemessen. Diese ist repräsentativ für die Zellzahl. Hierbei wurde jeweils an den Zeitpunkten 3h, 24h, 48h und 96h nach Behandlung der Zellen mit Cysteinproteaseinhibitoren die Messung durchgeführt. Auch in diesem Assay proliferierten die mit CA-074-Me behandelten Prostatakarzinomzellen am schlechtesten. Bei den LNCaP-Zellen war die Proliferation nach 96 Stunden um durchschnittlich 25 % im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert, bei den PC3-Zellen sogar um ca. 80 %. Allerdings zeigten sich diese Unterschiede bei beiden Versuchen ebenfalls erst nach 4 Tagen, während die Proliferation in den ersten beiden Tagen unverändert im Vergleich zur Kontrolle blieb.

D.2.2. Apoptose der PC3- und LNCaP-Zellen

D.2.2.1. Expression der Apoptoseproteine Bid, Bax und Bcl-xL

Da die Versuche mit siRNA-vermittelter Downregulation von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen eine gesteigerte Tendenz zur Apoptoseauslösung andeuteten, wurden die Experimente ebenfalls in Zellen durchgeführt, die zuvor mit Cysteinproteaseinhibitoren behandelt wurden, um einen Vergleich der Cathepsinwirkung auf mRNA- und Proteinebene zu ziehen. Deshalb wurde zunächst auch hier die Expression der Apoptoseproteine der Bcl-2-Familie untersucht. Das pro-apoptotische Protein Bid war in den Inhibitor-behandelten PC3-Zellen um ca. 20 – 30 % verstärkt exprimiert, während es in den Inhibitor-behandelten LNCaP-Zellen um ca. 50 – 100 % im Vergleich zur Kontrolle gesteigert war. Auch der Anteil des Fragments tBid an Gesamt-Bid war in allen Prostatakarzinomzellen, deren Cathepsinaktivität gehemmt worden war, höher als in den Kontrollzellen (Abb. D.16). Das antiapoptotische Protein Bcl-xL zeigte sich in seiner Expression jedoch unverändert im Vergleich zu den Kontrollzellen.

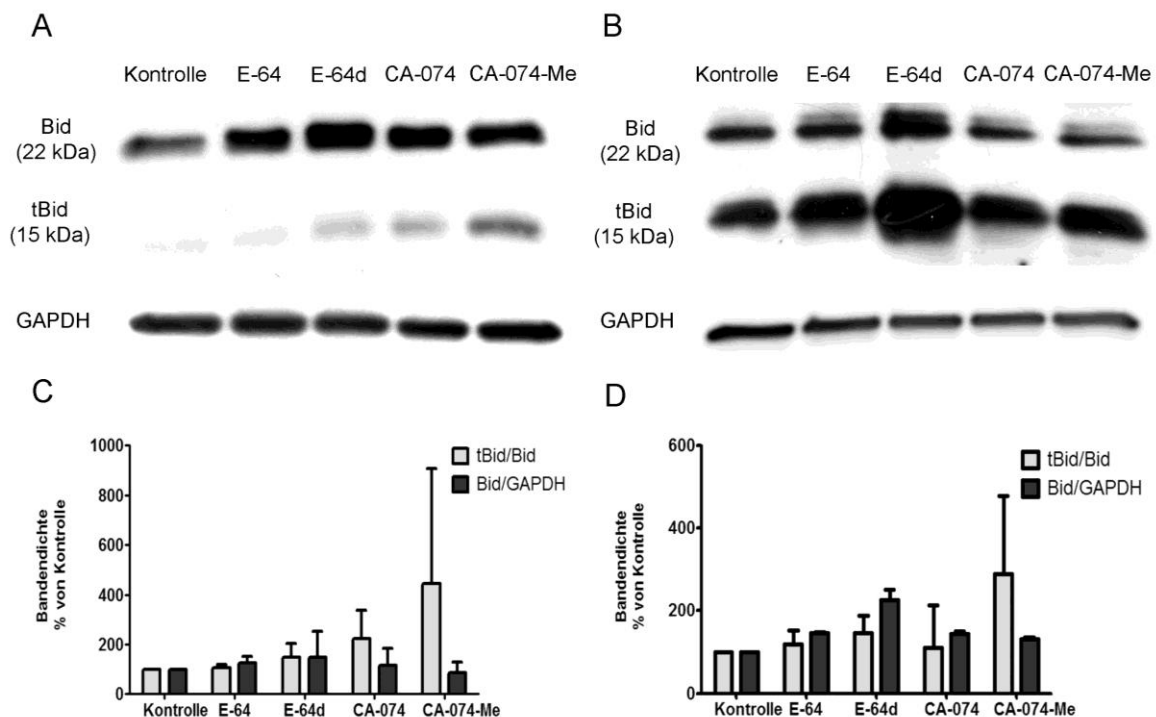


Abb. D.16: Expression des Apoptoseproteins Bid nach Inhibition von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen. A und B zeigen den Immunoblot von Bid und GAPDH, wobei Gesamt-Bid und das Fragment tBid aufgetragen sind. C und D stellen die densitometrische Auswertung von je 2 verschiedenen Immunoblots dar, bei der tBid auf Gesamt-Bid normalisiert wurde und Bid auf GAPDH. A und C: PC3-Zellen, B und D: LNCaP-Zellen, nach Behandlung mit Cysteinproteaseinhibitoren.

D.2.2.2. Annexin V-Färbung zur Apoptosemessung

Ebenso wie bei der Cathepsin-Downregulation auf mRNA-Ebene zeigte sich auch bei der Behandlung der PC3-Zellen mit den Cysteinproteaseinhibitoren E-64d und CA-074-Me bei der Annexin V-Färbung tendenziell eine erhöhte Apoptoseaktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. D.17, D.18).

Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Inkubation der Zellen mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK verhindert werden. Dies bedeutet, dass die beobachtete Apoptose in den PC3-Zellen mit inhibierter Cathepsin-Aktivität caspaseabhängig war. Somit ist auszuschließen, dass durch die Cysteinproteaseinhibitoren die Caspasen inhibiert wurden. Außerdem ist erkennbar, dass allgemein die Apoptoserate relativ gering – hier bei unter 1 % – ist. Das bestätigt die Aussage, dass die Cysteinproteaseinhibitoren in den verwendeten Konzentrationen keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausüben. Die verstärkte Apoptose kommt folglich nicht durch den toxischen Effekt der Epoxide auf die Zellen, sondern durch die Inhibition der Cathepsine zustande.

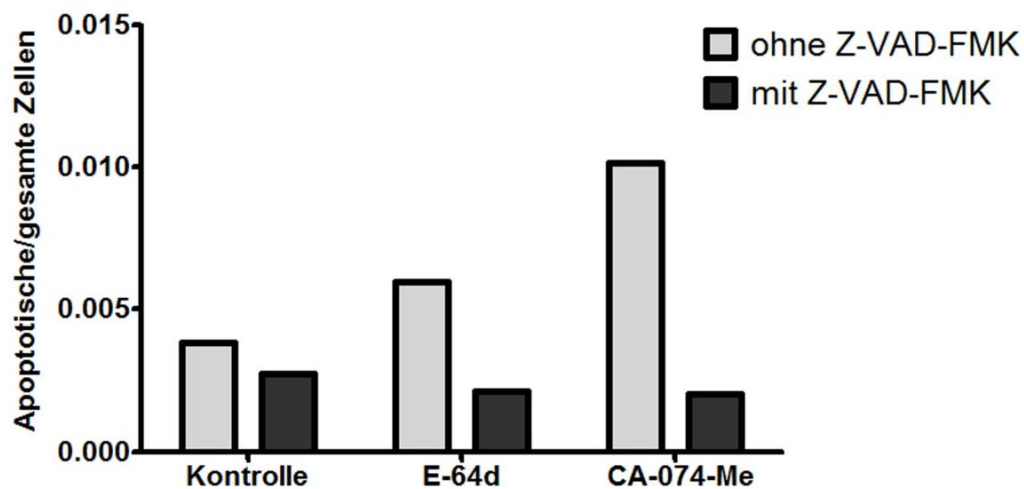


Abb. D.17: Apoptoserate nach Cathepsin-Inhibition anhand der Annexin V-Färbung in PC-3.

Das Diagramm zeigt die Auswertung der Annexin V –Färbung zur Apoptosedetektion in PC3-Zellen, die mit 5 μ M E-64d bzw. 5 μ M CA-074-Me und ggf. mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK behandelt worden waren. Es wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen durch die Gesamtzellzahl auf mehreren Bildern gezählt und der Quotient als Apoptoserate gebildet. Das Experiment wurde nur einfach durchgeführt, als Vergleichsmethode zum TUNEL-Assay.

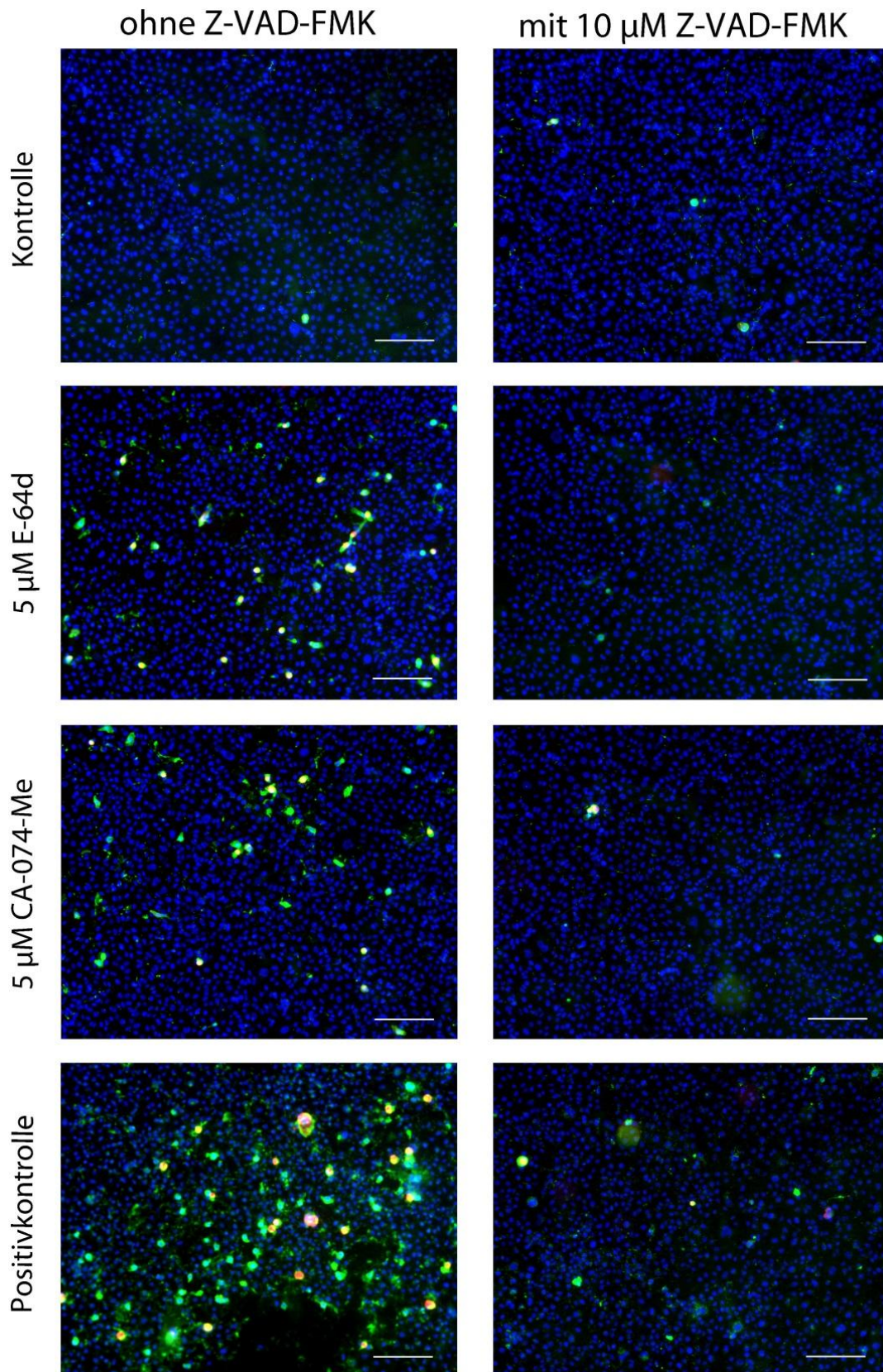


Abb. D.18: Annexin V-Färbung nach Cathepsin-Inhibition in PC-3. Die PC3-Zellen wurden mit 5 μ M E-64d und 5 μ M CA-074-Me behandelt, jeweils mit und ohne 10 μ M Z-VAD-FMK. Als Positivkontrolle diente die 6-stündige Behandlung mit 500 nM Staurosporin. Die Bilder wurden bei 10-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Der Größenstandard entspricht 200 μ m.

D.2.2.3. TUNEL-Assay

Neben den bereits beschriebenen Methoden zur Detektion apoptotischer Prozesse wurde bei der Inhibition von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen der TUNEL-Assay als Gold-Standard der Apoptose-Nachweise in beiden Zelllinien verwendet. Auch hier lag die Apoptoserate insgesamt meist unter 1%. Die Behandlung mit E-64d und CA-074-Me erhöhte die Apoptoserate um das ca. 6- bis 7-fache (Abb. D.19). Wenn die Behandlung gleichzeitig mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK erfolgte, trat der Effekt nicht auf.

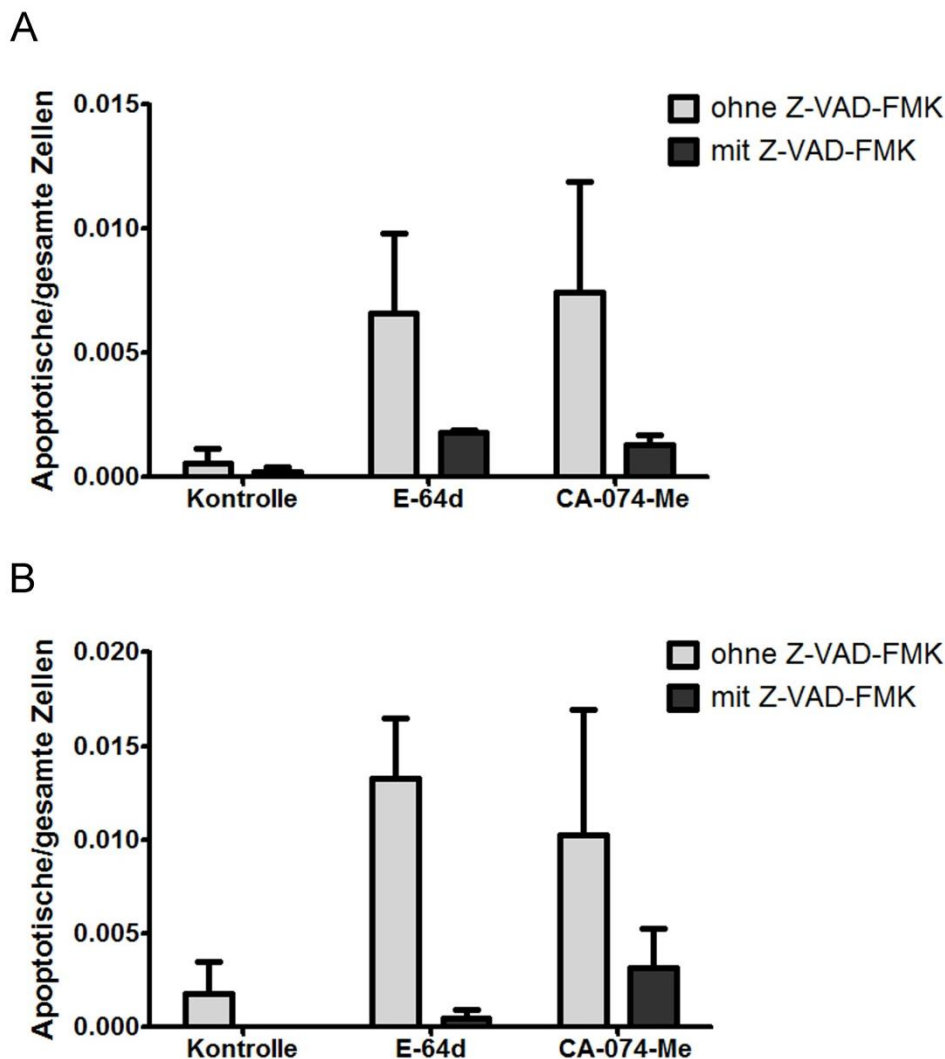


Abb. D.19: Apoptoseinduktion durch Cathepsin-Inhibition in Prostatakarzinomzellen (TUNEL-Assay). PC3-Zellen (A) und LNCaP-Zellen (B) wurden mit 5 μ M E-64d oder CA-074-Me (A: 5 μ M, B: 1 μ M) mit bzw. ohne 10 μ M Z-VAD-FMK für 48 Stunden behandelt und daraufhin der TUNEL-Assay durchgeführt. Der Assay wurde pro Zelllinie je zweimal durchgeführt und jeweils die apoptotischen Zellen in 5 Gesichtsfeldern in 20-facher Vergrößerung gezählt und durch die gesamte Zellzahl des Gesichtsfelds geteilt. Die Mittelwerte und Standardabweichung aus den beiden Versuchen wurden hier aufgetragen.

D.2.2.4. Messung der Apoptose über die Caspase 3-Aktivität

Ebenso wie bei den PC3-Zellen mit siRNA-vermittelter Downregulation von einzelnen Cathepsinen wurde auch bei PC3-Zellen, die mit Cysteinproteaseinhibitoren behandelt wurden, eine Messung der Caspaseaktivität zur Apoptosebestimmung durchgeführt. Bei den PC3-Zellen zeigte sich nach Behandlung mit den Cysteinproteaseinhibitoren jedoch kein Unterschied in der Caspaseaktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Daraus kann man schließen, dass E-64, E-64d, CA-074 und CA-074-Me Caspasen nicht oder nur in sehr geringen Maße inhibieren und somit spezifischer für die Cathepsine sind. Jedoch konnte die Caspaseaktivität in diesem Versuch durch die zusätzliche Behandlung mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK nicht reduziert werden. Wahrscheinlich spielen bei diesem Versuch eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle, die gar nicht alle ausgeschlossen werden können, oder das Substrat Ac-DEVD-AMC ist nicht spezifisch genug für Caspasen und kann vielleicht auch von anderen Proteasen gespalten werden.

D.2.3. Untersuchung des IGF-Signalwegs

Ebenso wie bei der Cathepsin-Downregulation durch siRNAs war bei den PC3-Zellen nach Inhibition der Cathepsin-Aktivität auf Proteinebene der Gesamt-IGF-I-Rezeptor im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert. Die Steigerung der IGF-IR-Proteinmenge war jedoch geringer als in den Zellen mit Cathepsin-Knockdown und betrug in den PC3-Zellen nur ca. 30% und in den LNCaP-Zellen ca. 10 – 20 %. In den LNCaP-Zellen, die mit CA-074-Me behandelt worden waren, war die Expression des IGF-IR etwas niedriger als in der Kontrolle (Abb. D.20).

Nach Stimulation der Prostatakarzinomzellen, in denen die Cathepsinaktivität inhibiert war, mit 50 ng/ml IGF-I für 20 min oder 200 ng/ml IGF-II für 10 min fanden sich keine Unterschiede bei der Phosphorylierung des IGF-IR. Auch die Untersuchung der Downstream-Signalmoleküle ERK und AKT auf deren Phosphorylierungszustände zeigte keine Veränderung durch die Behandlung der Zellen mit Cysteinproteaseinhibitoren.

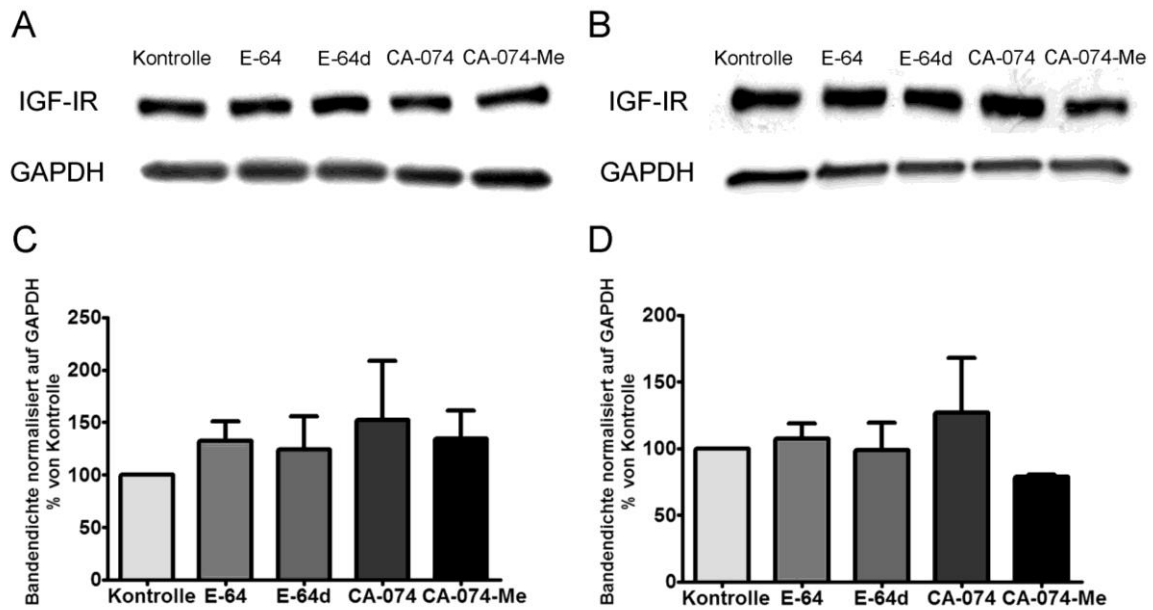


Abb. D.20: Expression des IGF-I-Rezeptors nach Cathepsin-Inhibition in Prostatakarzinomzellen. Der Immunoblot für IGF-IR wurde in PC3-Zellen (A und C) und LNCaP-Zellen (B und D) durchgeführt, die mit den Cysteinproteaseinhibitoren E-64, E-64d, CA-074 und CA-074-Me behandelt wurden. Die densitometrische Auswertung (C und D) erfolgte anhand von 3 (C) bzw. 2 (D) unabhängigen Versuchen.

E. Diskussion

Cathepsine sind als lysosomale Cysteinproteasen physiologisch hauptsächlich am Abbau fehlerhafter Proteine beteiligt. Doch seit der Entdeckung, dass Cathepsine in vielen Tumoren eine erhöhte Expression aufweisen, wurden ihre Funktionen bei der Tumorentstehung und –progression genauer erforscht. Dabei zeigte sich, dass diese Proteasen bei der Invasion und Migration von Tumorzellen – insbesondere im Prostatakarzinom – eine Rolle spielen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle der Cathepsine X, B, L und K bei Prozessen wie zellulärer Seneszenz, Apoptose und Proliferation und bei proliferativen Signalwegen in Prostatakarzinomzellen untersucht.

E.1. Beteiligung von Cathepsinen an Prozessen der Tumorprogression

Die Eigenschaft, die maligne Tumorzellen definiert, ist die Fähigkeit, aus dem primären Gewebekompartiment auszubrechen. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die proteolytische Aktivität von Proteasen (Edwards and Murphy, 1998). Als Cysteinproteasen sind Cathepsine in vielen humanen Tumoren verstärkt exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in Prozessen wie Angiogenese, Zellproliferation, Tumorwachstum und Tumoringression (Joyce and Hanahan, 2004). In RIP1-Tag2 transgenen Mäusen, die anhand reproduzierbarer Stadien Tumore entwickeln, konnte durch Inhibition der Cathepsin-Aktivität mittels eines Breit-Spektrum-Cysteinproteaseninhibitors das Wachstum, die Gefäßdichte und die Invasivität der Tumoren gehemmt werden (Joyce et al., 2004). Cathepsine können die Invasion und Metastasierung von Tumoren fördern, indem sie Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronektin, Laminin, Elastin, Proteoglykane oder die Kollagene I, IV und XVII, und Zelladhäsionsproteine wie E-Cadherin abbauen (Ibrahim et al., 2016; Pulz and Strefezzi, 2016). Zugleich vermitteln Cathepsine die Freisetzung und Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren wie TGF- β , bFGF, EGF, IGF und VEGF (Obermajer et al., 2008).

Die Cathepsine X, B, L und K wurden als molekulare Ziele ausgewählt, da sie alle in Prostatakarzinomzellen stark überexprimiert sind im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe (Brubaker et al., 2003; Goo et al., 2009; Mohamed and Sloane, 2006; Nagler et al., 2004; Podgorski et al., 2005). Dabei ist Cathepsin X nicht nur in Adenokarzinomen der Prostata erhöht, sondern insbesondere in dessen Vorstufe der prostaticen intraepithelialen Neoplasie (PIN), weshalb davon ausgegangen wird, dass Cathepsin X vor allem an frühen Prozessen der Tumorentwicklung beteiligt ist. Doch im Kontrast dazu steht die Hypothese, dass jeder Tumor bereits während seiner Entstehung die Fähigkeit zur Metastasierung erhält, obwohl diese meist erst

zu einem späteren Zeitpunkt auftritt (Bernards and Weinberg, 2002). Dafür sprechen ebenfalls die Entdeckungen, dass Cathepsin X-defiziente Prostatakarzinomzellen eine verringerte Fähigkeit zur Invasion zeigten (Kraus et al., 2012) und Cathepsin X – in dieser Studie unter dem Synonym Cathepsin Z – an der Induktion der Epithelial-mesenchymalen Transition im hepatozellulären Karzinom beteiligt war (Wang et al., 2011). Cathepsin X verfügt als Carboxypeptidase jedoch nur über eine geringfügige endoproteolytische Aktivität und ist daher nicht in der Lage, extrazelluläre Matrix abzubauen. Es wird vermutet, dass die Cysteinprotease bei anderen Prozessen der Tumorprogression eine Rolle spielt, insbesondere bei der Regulation von Signalwegen. Diesbezüglich stellte sich bereits heraus, dass Cathepsin X mit Integrin-Rezeptoren interagieren kann (Kos et al., 2014; Lechner et al., 2006). Die Cathepsine B und L weisen in vielen Tumoren eine veränderte Expression auf und sind an vielen Prozessen der Tumorentwicklung beteiligt. In RIP1-Tag2-Mäusen mit Knockout von Cathepsin B oder L wurde vermehrter Zelltod, reduzierte Tumorzellproliferation und verminderte Tumordinvasion im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Cathepsin B-Knockout-Mäuse wiesen zusätzlich eine verringerte Tumolvaskularität auf (Gocheva et al., 2006). In Prostatakarzinomzellen bewirkte eine Inhibition der Aktivität der Cathepsine B und L eine reduzierte Fähigkeit zur Invasion (Colella et al., 2004). In den letzten Jahren wurden Inhibitoren der Cathepsine S, K, B und L entwickelt und in klinischen Studien zur Behandlung von Osteoporose und Krebs getestet (Payne et al., 2014; Siklos et al., 2015). So wurde die Bildung von Knochenmetastasen bei Brustkrebs beispielsweise durch die Inhibition von Cathepsin B mittels CA-074 limitiert (Withana et al., 2012). Prostata- und Mammakarzinomzellen, die mit dem Cathepsin L -Inhibitor KGP94 behandelt wurden, wiesen eine abgeschwächte Tumorzellinvasion und –migration auf (Sudhan and Siemann, 2013). Die Besonderheit von Cathepsin K liegt darin, dass diese potente Kollagenase in Knochenmetastasen von Prostatakarzinomen vermehrt vorhanden ist und weniger in primären Prostatakarzinomen, während in gesundem Prostatagewebe kein Cathepsin K vorkommt (Brubaker et al., 2003). Gegen Cathepsin K wurde in den letzten Jahren der selektive Inhibitor Odanacatib entwickelt, der in klinischen Studien bereits gute Erfolge in der Behandlung von Knochenmetastasen und postmenopausaler Osteoporose erzielt hat (Anderson et al., 2014; Papachristou et al., 2012; Zajic et al., 2016).

E.2. Suppression von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen

Um den Einfluss von Cathepsinen auf Prostatakarzinomzellen zu erforschen, wurden ausgewählte Cathepsine in zwei Zelllinien mit zwei verschiedenen Methoden herunterreguliert. Dazu wurden PC-3 und LNCaP-Zellen verwendet. Während die

PC3-Zellen aus einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms isoliert worden waren, stammten die LNCaP-Zellen aus einer Lymphknotenmetastase. Beide Zelllinien sind bereits seit langer Zeit in der Forschung etabliert und werden häufig als Modellzelllinien für Prostatakarzinome benutzt (Aryankalayil et al., 2014; Munoz-Moreno et al., 2016; Xu et al., 2014).

Seitdem herausgefunden wurde, dass doppelsträngige RNA in *Caenorhabditis elegans* zu einer Sequenz-spezifischen Herabregulation eines Gens führt (Fire et al., 1998), wurde die Methode der RNA-Interferenz häufig für die Untersuchung der Funktion von Genen genutzt (Kim, 2003). In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Technik der RNA-Interferenz verwendet, um mit spezifischen siRNAs gegen Cathepsin X, B, L oder K deren Genexpression einzeln herabzusetzen. Als Kontrollen wurden eine „*non-silencing*“ bzw. „*scrambled*“ siRNA, die gegen kein Gen gerichtet ist, und eine fluoreszente AF-488-markierte siRNA eingesetzt.

Als zweite Methode zur Suppression von Cathepsinen wurden die Cysteinproteaseinhibitoren E-64 und CA-074 verwendet. E-64 ist ein allgemeiner Cysteinproteaseninhibitor, während CA-074 als ein Cathepsin B-spezifischer Inhibitor gilt (Premzl et al., 2006). E-64d und CA-074-Me sind Derivate von E-64 bzw. CA-074, die membranpermeabel sind (Murray et al., 1997; Premzl et al., 2006). Doch für die untersuchten Cathepsine stellte sich heraus, dass E-64 zwar die Cathepsine B und L sehr gut inhibiert, jedoch Cathepsin X deutlich schwächer. CA-074 hemmte dagegen Cathepsin B am stärksten, jedoch zusätzlich auch Cathepsin L zu einem kleinen Teil (Tab. E.1). Es wurde darauf geachtet, dass Inhibitorkonzentrationen verwendet wurden, die zu keiner Zytotoxizität führten. In anderen Studien wurde gezeigt, dass sich das Zellüberleben von Endothelzellen (HUVEC) durch die Behandlung mit 10 μM der Inhibitoren E-64, CA-074 oder CA-074-Me nicht veränderte (Premzl et al., 2006), ebenso wenig das von Melanomzellen durch 100 μM E-64 (Dennhofer et al., 2003). Colella et al. verwendeten in den Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 50 μM E-64 (Colella et al., 2002). Daraus lässt sich schließen, dass die verwendeten Konzentrationen von 5 bzw. 10 μM nicht zu Zytotoxizität führten.

	Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_2/K_i ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
	E-64	CA-074
Cat B	1,60E+05	1,80E+05
Cat L	1,10E+05	2,30E+03
Cat X	5,20E+02	1,60E+01

Tab. E.1: Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung von Cysteinproteaseinhibitoren für Cathepsine. Nägler, nicht publiziert

Die Downregulation der Cathepsine in den Prostatakarzinomzellen wurde demnach sowohl mittels RNA-Interferenz auf mRNA-Ebene, als auch mittels Cysteinproteaseninhibitoren auf Proteinebene durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich ähnliche Ergebnisse zeigen. Häufig verwenden Autoren beide Mechanismen der Downregulation, um ihre Ergebnisse zu bestätigen. So führten Zhang et al. einen Knockdown von Cathepsin L mittels shRNA und eine Suppression von Cathepsin L mit dem Inhibitor Z-FY-CHO in Gliomzellen durch, um den Einfluss von Cathepsin L auf die Strahlenempfindlichkeit dieser Zellen zu untersuchen (Zhang et al., 2015). Auch Sudhan et al. verwendeten einen Knockdown von Cathepsin L mittels shRNA wie eine Inhibition mittels KGP94, um den Effekt von Cathepsin L auf die Bildung von Knochenmetastasen bei Prostatakarzinomzellen zu testen (Sudhan et al., 2016). Um die Rolle von Cathepsin B in rheumatoider Arthritis zu untersuchen, wurden ebenfalls RNA-Interferenz und der Inhibitor CA-074-Me zur Downregulation von Cathepsin B verwendet (Tong et al., 2014).

E.3. Rolle der Cathepsine bei der Proliferation von Tumorzellen

Cathepsine spielen eine wichtige Rolle bei vielen Prozessen, welche die Tumorentwicklung unterstützen, wie z.B. Angiogenese, Invasion, Metastasierung und Proliferation (Tan et al., 2013). Als zugrundeliegender Mechanismus wird dabei die Freisetzung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch die proteolytische Aktivität der Cathepsine angenommen (DeClerck et al., 2004; Obermajer et al., 2008; Palermo and Joyce, 2008). Besonders bei den Cathepsinen B, L und S ist bekannt, dass sie die Proliferation von Tumorzellen fördern. Es wurde gezeigt, dass eine reduzierte Cathepsin L-Expression in murinen Lungenkarzinomzellen zu einer verringerten IGF-I-induzierten Proliferation führte (Navab et al., 2008). Die Downregulation von Cathepsin L in Brustkrebszellen inhibierte signifikant die Proliferation und Invasion der Tumorzellen (Qin et al., 2016). Ebenso wiesen Endometriumkarzinomzellen, in denen ein Knockdown von Cathepsin B durchgeführt worden war, eine reduzierte Zellproliferation auf (Bao et al., 2013). In humanen T-Zellen suppressierte der Cathepsin B – Inhibitor Z-FA-FMK die Zellproliferation (Rajah and Chow, 2015). In einem Kolonkarzinom-Mausmodell mit Cathepsin S-Knockout wurde eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation nachgewiesen, die durch zusätzliche Deletion von Cathepsin S in den Tumor-assoziierten Zellen nochmals verstärkt wurde (Small et al., 2013).

Im Gegensatz zu den Daten aus der Literatur zeigte sich in den BrdU-Assays zur Bestimmung der Proliferation der Prostatakarzinomzellen nach Knockdown der Cathepsine X, B, L oder K jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen den

Cathepsin-defizienten Zellen und den Kontrollzellen. Das könnte daran liegen, dass bei der Downregulation eines Cathepsins der Effekt durch eine verstärkte Expression anderer Cathepsine oder Faktoren kompensiert wird, sodass die Defizienz eines einzelnen Cathepsins keine sichtbare Auswirkung auf die Proliferation der Tumorzellen hat. Dafür spricht die Beobachtung, dass in einigen Untersuchungen mehrere Proteasen inhibiert wurden, um einen anti-proliferativen Effekt zu erzielen. Meningeomzellen zeigten erst nach kombinierter Downregulation des Serinproteaserezeptors uPAR und von Cathepsin B eine reduzierte TGF- β -induzierte Proliferation (Gogineni et al., 2012) und nur in Mäusen mit kombiniertem Cathepsin X und B-Knockout war das Brustkrebswachstum signifikant verzögert, während sich bei den einzelnen Knockouts nur ein entsprechender Trend abgezeichnet hatte (Sevenich et al., 2010). In einem Mausmodell eines neuroendokrinen Pankreastumors mit kombiniertem Knockout der Cathepsine B und S wurde eine nicht signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation festgestellt, wobei gleichzeitig eine erhöhte Expression von Cathepsin X gemessen wurde, die einen Kompensationsmechanismus nahelegt (Akkari et al., 2016). Auch eine Stimulation mit IGF-I oder IGF-II nach vorangegangenem Hungern konnte die Proliferation in den untersuchten PC3-Zellen nicht steigern. Das könnte eventuell dadurch begründet werden, dass aufgrund der Eigenproduktion und autokrinen Stimulation mittels IGF-II der Prostatakrebszellen (Kimura et al., 1996) der IGF-IR bereits gesättigt ist, die Zellen sehr stark proliferieren und nicht weiter durch IGFs stimuliert werden können. Es gibt darüber hinaus viele andere Mechanismen, durch die Tumorzellen ihr Wachstum fördern; so kann es sein, dass dieses bereits beschleunigte Wachstum der Krebszellen nicht mehr durch die Gabe der Wachstumsfaktoren gesteigert werden kann. Eine andere Möglichkeit ist, dass die verwendeten Konzentrationen von 50 ng/ml IGF-I und 200 ng/ml IGF-II zu niedrig waren. Bei Untersuchungen von Chien et al. wiesen nur die PC3-Zellen und LNCaP-Zellen, die mit 100 ng/ml IGF-I behandelt worden waren, eine gesteigerte Zellproliferation auf (Chien et al., 2016).

Um die Wirkung der Inhibition mehrerer Cathepsine auf die Proliferation der Prostatakarzinomzellen zu testen, wurden die Cysteinproteaseinhibitoren E-64/E-64d und CA-074/CA-074-Me verwendet. Dabei war bei Prostatakarzinomzellen, deren Cathepsinaktivität mit dem Cysteinproteaseinhibitor CA-074-Me über einen Zeitraum von 4 Tagen gehemmt worden war, die Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen um 65 % (PC3) bzw. 75 % (LNCaP) reduziert, was mit zwei unabhängigen Methoden geprüft wurde. Bei der Behandlung der Zellen mit E-64, E-64d oder CA-074 war jedoch keine Veränderung der Proliferation nachweisbar. CA-074-Me ist ein Derivat des Cathepsin B-spezifischen Inhibitors CA-074, der durch die Methylgruppe besser zellgängig ist als CA-074 und deshalb leichter in die Zielzellen gelangt. Dies deutet darauf hin, dass vor allem die intrazelluläre Form von Cathepsin

B an der Tumorzellproliferation beteiligt ist. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Untersuchung der Invasivität von Tumorzellen von Szpaderska et Frankfater festgestellt: während die Inhibition von extrazellulärem Cathepsin B durch CA-074 keinen Effekt auf die Invasivität von Melanom- und Prostatakarzinomzellen hatte, reduzierte der membranpermeable Inhibitor CA-074-Me die Invasion signifikant (Szpaderska and Frankfater, 2001). Auch Rose et al. stellten einen Unterschied in der Wirkung von CA-074 und CA-074-Me fest: in Kaposi-Sarkom-Zellen, die durch Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus (KSHV) aus DMVEC-Zellen transformiert worden waren, konnte der membranpermeable Cathepsin B-Inhibitor CA-074-Me die Transformation und Proliferation hemmen, der nicht-membranpermeable Inhibitor CA-074 jedoch nicht (Rose et al., 2007). Ein Knockdown von Cathepsin B in den untersuchten Prostatakarzinomzellen führte jedoch nicht zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzellproliferation. Das liegt womöglich daran, dass die Inhibition auf Proteinebene zu einer stärkeren Reduktion der Cathepsin B-Aktivität führt als der Knockdown auf mRNA-Ebene.

Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Inhibitoren CA-074 und CA-074-Me kann in deren unterschiedlicher Spezifität liegen. Montaser et al. haben gezeigt, dass CA-074 sehr spezifisch Cathepsin B inhibiert, während CA-074-Me zusätzlich zu Cathepsin B auch Cathepsin L hemmt (Montaser et al., 2002). Dies bestätigt sich ebenfalls in den Ergebnissen dieser Arbeit: CA-074 senkte die gesamte Cathepsinaktivität der Prostatakarzinomzellen sogar in hohen Konzentrationen nur um maximal 60%, während CA-074-Me diese in hohen Konzentrationen um bis zu 95% reduzierte und daher weniger spezifisch agiert. Das würde darauf hinweisen, dass die Cathepsine B und L bei der Stimulation der Proliferation von Prostatakarzinomzellen eine wichtigere Rolle spielen als andere Cathepsine oder Cysteinproteasen. Dafür sprechen zahlreiche Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen Cathepsin B bzw. L und der Proliferation von Tumorzellen aufgedeckt haben (Bao et al., 2013; Gocheva et al., 2006; Gogineni et al., 2012; Navab et al., 2008; Yan et al., 2010). Da die Downregulation durch Knockdown von Cathepsin B oder L jeweils alleine nicht ausreichte, um die Tumorzellproliferation zu senken, wird davon ausgegangen, dass der Ausfall des einen durch das andere kompensiert wird und deshalb nur bei der kombinierten Inhibition von Cathepsin B und L durch CA-074-Me eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation auftrat.

Cathepsin B wird – gemeinsam mit Cathepsin L – auch von E-64 bzw. dem zellgängigen E-64d sehr effektiv inhibiert, doch die Behandlung mit diesen Inhibitoren führte nicht zu einer reduzierten Zellproliferation. E-64 und E-64d hemmen nicht spezifisch, sondern viele weitere Proteasen. Es wird daher angenommen, dass

andere Proteasen, die von E-64 bzw. E-64d inhibiert werden, jedoch nicht von CA-074-Me, eine antiproliferative Wirkung besitzen. Dementsprechend würde die gemeinsame Hemmung des pro-proliferativen Cathepsin B und dieser antiproliferativen Cysteinproteasen durch E-64 bzw. E-64d die Proliferation der Tumorzellen insgesamt nicht verändern. E-64 und E-64d hemmen ein breites Spektrum an Cysteinproteasen, wie beispielsweise die Cathepsine B, L, H, Calpaine und als einzige Serinprotease Trypsin. Von den Calpainen ist bekannt, dass sie in Kolonkarzinomzellen das Protein Beta-Catenin spalten, da Calpaininhibitoren wie Calpastatin und E-64 den Abbau von Beta-Catenin hemmen (Li and Iyengar, 2002). Der Abbau von Beta-Catenin durch Calpaine führt zu einer Blockade des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, wodurch die Zellproliferation von Prostatakarzinomzellen inhibiert wird (Lu et al., 2009). Eine antiproliferative Wirkung von Calpainen zeigten auch Kondo et al. und Moretti et al. In Epithelzellen von Ratten förderte der Einsatz von membran-permeablen Calpaininhibitoren die Zellproliferation (Kondo et al., 2015) und in Melanomzellen senkte die Überexpression von Calpain-3 die Zellproliferation (Moretti et al., 2015). Das bedeutet, dass die Inhibition der Calpaine durch E-64 und E-64d eine Steigerung der Zellproliferation induzieren könnte, während die gleichzeitige Inhibition von Cathepsin B zu einer Reduktion der Krebszellvermehrung führen würde. Insgesamt inhibieren E-64 und E-64d viele verschiedene Proteasen, die in einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle agieren. Die Ergebnisse bilden die Summe dieser Prozesse ab, wobei einzelne Prozesse nicht zur Darstellung kommen.

Interessanterweise trat der Effekt der Reduktion der Tumorzellproliferation erst nach einer Behandlung der Zellen mit CA-074-Me über 96 Stunden auf, war nach 24 oder 48 Stunden jedoch noch nicht messbar. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Untersuchungen eines Knockdowns von Cathepsin B in Endometriumkarzinomzellen, bei denen eine reduzierte Tumorphiliferation ebenfalls erst nach 96 bis 120 Stunden deutlich wurde (Bao et al., 2013). Anscheinend dauert es ca. 4 Tage, bis die Wirkung der Inhibition von Cathepsin B eine Auswirkung auf die Proliferation hat. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die reduzierte Proliferation an einer verminderten Zellzahl durch eine verstärkte Apoptoserate lag. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die Apoptoseinduktion nicht sehr stark ausgeprägt war und bei Inhibition durch E-64d im gleichen Maße stattfand. Auch bei der Verwendung einer zweiten Methode – dem CyQuant-Assay – wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, welche die Bedeutung der Proliferationshemmung durch 4-tägige Behandlung mit CA-074-Me in Prostatakarzinomzellen bekräftigen. In PC3-Zellen war die Proliferation nach 4 Tagen stark erniedrigt und auch in LNCaP-Zellen führte CA-074-Me zu einer Reduktion der Zellproliferation.

Insgesamt ist es eine interessante Entdeckung, dass die Inhibition von intrazellulärem Cathepsin B in Prostatakarzinomzellen zu einem starken Rückgang der Proliferation führt. Weitere Erforschungen sind nötig, um das Phänomen genauer zu charakterisieren und eine mögliche klinische Anwendung in der Krebstherapie zu untersuchen.

E.4. Auswirkung der Cathepsindefizienz auf Tumorsuppressormechanismen

E.4.1. Zelluläre Seneszenz

Die zwei großen Gruppen von Erkrankungen des Alters sind degenerative Erkrankungen und Krebs. Um das delicate Gleichgewicht zwischen Stammzellproliferation zur Gewebsregeneration bei degenerativen Erkrankungen und dem Risiko der Krebsentstehung zu balancieren, sind viele Regulierungsmechanismen nötig, wie beispielsweise zelluläre Seneszenz und Apoptose (Beausejour and Campisi, 2006). Zelluläre Seneszenz ist ein wichtiger Tumorsuppressormechanismus, bei dem die betroffenen Zellen irreversibel aus dem regulären Zellzyklus austreten und ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren. Senescente Zellen weisen eine typische Morphologie von flachen, vergrößerten Zellformen und eine erhöhte Expression von Seneszenz-Markern wie Beta-Galaktosidase und Tumorsuppressorgenen sowie eine erniedrigte Expression von Zellzyklus-stimulierenden Genen auf (Lujambio, 2016; Rufini et al., 2013). Die Auslöser dieses Mechanismus sind Stressoren wie Telomerverlust, onkogene Stimulation oder DNA-Schäden, die zu einer malignen Transformation der betroffenen Zelle führen könnten (Campisi, 2013).

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde entdeckt, dass Fibroblasten, in denen Cathepsin X durch RNA-Interferenz herunterreguliert wurde, einen typischen seneszenten Phänotyp mit flachen und vergrößerten Zellkörpern aufweisen und über eine erhöhte Expression von Biomarkern der Seneszenz verfügen (Kraus et al., 2011). Auch ein Knockdown von Cathepsin D induzierte zelluläre Seneszenz in HeLa-Zellen (Su et al., 2015). Deshalb wurde vermutet, dass Cathepsin-Defizienz in Prostatakarzinomzellen ebenfalls Seneszenz auslösen könnte. Doch es stellte sich heraus, dass in Prostatakarzinomzellen nach Downregulation der Cathepsine X, B, L oder K auf mRNA-Ebene kein Anstieg der Seneszenzmarker p16INK4a und p21/WAF1/CIP1 erfolgte. Zudem erschienen die Cathepsin-defizienten Zellen in ihrer Morphologie nicht verändert im Vergleich zu den Kontrollzellen und sie vermehrten sich weiterhin, weshalb nicht davon ausgegangen wird, dass durch Downregulation von Cathepsinen zelluläre Seneszenz in

Prostatakarzinomzellen induziert wird. Es gibt verschiedene Gründe, warum Cathepsin X-Defizienz in Fibroblasten und Prostatakarzinomzellen unterschiedliche Effekte erzielt. Da Seneszenz ein Tumorsuppressormechanismus des Körpers ist, der verhindern soll, dass Zellen überhaupt erst maligne entarten, wird vermutet, dass Tumorzellen wie die Prostatakarzinomzellen bereits bei der Tumorentstehung diesem Tumorsuppressormechanismus ausgesetzt waren und dagegen Resistenzen entwickelt haben, um die Seneszenz zu umgehen (Saab, 2011). Es gibt zwei Signalwege, die zu zellulärer Seneszenz führen: den p53/p21-Weg und den p16/pRB-Weg. Während der malignen Karzinogenese wird mindestens einer durch genetische Mutationen inaktiviert, meistens jedoch beide (Campisi et al., 2011). In der Mehrheit der menschlichen Tumoren ist das Tumorsuppressorgen p53 mutiert oder verloren gegangen (Rufini et al., 2013). P53 reguliert in geschädigten Zellen nicht nur zelluläre Seneszenz, sondern auch Apoptose und Autophagie. Dabei wurde festgestellt, dass die Entscheidung zu Seneszenz oder Apoptose Zelltyp-abhängig ist, z.B. wird in Fibroblasten eher zelluläre Seneszenz induziert und in Lymphozyten eher Apoptose (Vicencio et al., 2008). Dies würde dafür sprechen, dass die Defizienz von Cathepsin X nur in Fibroblasten, aber nicht in Prostatakarzinomzellen Seneszenz auslösen kann.

Andere Forschungsgruppen haben eine Methode gefunden, durch die Seneszenz in Prostatakarzinomzellen induziert wurde: Androgendeprivationstherapie, die bereits bei der Behandlung von fortgeschrittenen Prostatakarzinomen eingesetzt wird. In Prostatakarzinomzellen, denen Androgene entzogen wurden, wurde eine erhöhte Expression des Biomarkers Beta-Galaktosidase und eine erhöhte Sekretion von IGF-BP-3 und Cathepsin B – zweier Marker für den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) – festgestellt (Kawata et al., 2016; Pernicova et al., 2011). Der SASP, der von seneszenten Zellen exprimiert wird, weist eine gesteigerte Sekretion von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen auf, die sowohl positive Effekte wie Gewebsregeneration und Immunantwort zeigen, als auch schädliche Wirkungen haben wie die Förderung degenerativer Erkrankungen (Campisi et al., 2011; Lujambio, 2016) und sogar die Förderung der Tumorentwicklung (Pawlikowski et al., 2013). Deshalb ist fraglich, ob die Auslösung von zellulärer Seneszenz als therapeutische Option in der Krebsbehandlung eher nutzen oder schaden würde.

E.4.2. Apoptose

Ein weiterer Mechanismus, um Zellen vor Stress und maligner Transformation zu schützen, ist neben zellulärer Seneszenz die Auslösung des programmierten Zelltods

Apoptose, die ebenfalls durch das Tumorsuppressorgen p53 reguliert wird (Hasty and Christy, 2013; Jeong et al., 2016; Vicencio et al., 2008). Da die Induktion von Apoptose in Tumorzellen das Ziel vieler Krebstherapien ist, um eine Tumorregression zu erreichen (Zielinski et al., 2013), ist jegliche Beobachtung eines verstärkten Zelltods in Krebszellen von großer Bedeutung.

Bei Betrachtung der Prostatakarzinomzellen, in denen Cathepsin X, B, L oder K durch RNA-Interferenz herunterreguliert war, fiel im Mikroskop bereits mit bloßem Auge auf, dass es eine erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen im Zellkulturmedium gab. Daraufhin konnte in zwei verschiedenen Assays zur Bestimmung der Apoptose – einer Färbung basierend auf dem Auftreten von Annexin V in der Zellmembran früh-apoptotischer Zellen und dem TUNEL-Assay als Goldstandard – gezeigt werden, dass die Apoptoserate in Cathepsin-defizienten PC3-Zellen und LNCaP-Zellen deutlich erhöht war im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen. Hierbei war der gleiche Effekt bei allen vier Cathepsinen X, B, L und K zu sehen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung: Nach Downregulation der Cathepsine B oder L stieg die Apoptoserate deutlich an, während sie bei Defizienz der Cathepsine X oder K in den verschiedenen Experimenten auch gesteigert war, jedoch stärkeren Schwankungen unterworfen war. Auch bei der unspezifischeren Inhibition von Cathepsinen durch die Cysteinproteaseinhibitoren E-64d und CA-074-Me wurde das gleiche Ergebnis erzielt: die Cathepsin-Hemmung verstärkte die Apoptoserate der PC3- und LNCaP-Zellen. Da die Apoptoserate nach der Downregulation von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen in den meisten Versuchen lediglich eine geringe Erhöhung aufwies, ist es nicht komplett auszuschließen, dass es sich bei den Ergebnissen bloß um eine normale Schwankung der basalen Apoptose handelt, doch die Tatsache, dass bei der Verwendung mehrerer verschiedener Methoden stets dieselbe Tendenz aufgezeigt wurde, deutet stark darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Cathepsin-Downregulation und vermehrter Apoptose von Prostatakarzinomzellen vorliegt. Dies zeigen auch die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen, die einen Zusammenhang zwischen der Inhibition von Cathepsinen und der Auslösung von Apoptose in Tumorzellen entdeckten. In Neuroblastomzellen wurde durch die Cathepsin-Inhibitoren Pepstatin A, E-64 und CA-074-Me Caspase-abhängige Apoptose ausgelöst (Castino et al., 2002) und ebenso durch die Inhibition der Cathepsine B und L durch FYAD (Cartledge et al., 2013; Colella et al., 2010). In Kolonkarzinomzellen wurde durch die Inhibition von Cathepsin D die Acetat-induzierte Apoptose erhöht (Oliveira et al., 2015). Neben Cathepsin S, dessen Inhibition in humanen Glioblastomzellen Autophagie und Apoptose induzierte (Zhang et al., 2014) und ebenfalls in hepatozellulären Karzinomzellen Apoptose auslöste (Wang et al., 2015), wurde bisher besonders bei den Cathepsinen B und L ein anti-apoptotischer Effekt nachgewiesen. Während die

Herabregulation von uPAR (urokinase-type plasminogen activator rezeptor) und Cathepsin B in Gliomzellen Apoptose hervorrief (Malla et al., 2010), induzierte die gemeinsame siRNA-vermittelte Downregulation von MMP-9, uPAR und Cathepsin B Apoptose in Prostatakarzinomzellen (Nalla et al., 2010). Bei reduziertem Expressionslevel von Cathepsin L war in murinen Tumorzellen die Tumorzellapoptose gesteigert (Navab et al., 2008). Eine andere Forschungsgruppe fand heraus, dass durch Inhibition von Cathepsin L die Anfälligkeit für Apoptose bei Glioblastomzellen verstärkt werden konnte. Dabei erhöhte die Defizienz von Cathepsin L die Expression der Caspasen 3 und 7 und anderer pro-apoptotischer Faktoren wie p53 und Prohibitin auf mRNA-Ebene. Auf der anderen Seite jedoch kann Cathepsin L auch das pro-apoptotische Protein Bid so spalten, dass sein aktives Fragment tBid die Ruptur der Mitochondrienmembran, den Austritt von Cytochrom C und dann den apoptotischen Zelltod auslöst (Kenig et al., 2011). In Gliomstammzellen erhöhte der Knockdown von Cathepsin L die Radiosensitivität, reduzierte das Tumorzellwachstum und förderte Apoptose (Wang et al., 2016). Doch auch Cathepsin X scheint an der Inhibition von Apoptose in Tumoren beteiligt zu sein. Der Knockout von Cathepsin B und S im Mausmodell eines neuroendokrinen Pankreastumors wurde durch die verstärkte Expression von Cathepsin X kompensiert: erst der Knockout aller 3 Cathepsine gemeinsam führte zu einer gesteigerten Apoptose und verringerten Invasion (Akkari et al., 2016). Der Knockdown von Cathepsin X in Magenkarzinomzellen induzierte Apoptose, die durch zusätzliche Defizienz des ribosomalen Proteins RPLPO noch gesteigert wurde (Teller et al., 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Beteiligung von Cathepsin B und L an der Apoptoseauslösung und weisen darauf hin, dass die Cathepsine X und K eine ähnliche Wirkung haben könnten.

Bei der Suche nach dem Mechanismus der Apoptoseauslösung wurde festgestellt, dass einige Proteine der Bcl-2-Familie in den Cathepsin-defizienten bzw. –inhibierten Prostatakarzinomzellen in ihrer Expression und Aktivität verändert waren. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 war auf mRNA-Ebene in den Cathepsin-defizienten Zellen herabgesetzt, während das pro-apoptotische Protein Bid auf Proteinebene verstärkt exprimiert war und besonders dessen aktives Fragment t-Bid. Der genaue Signalweg, der für die Apoptoseauslösung nach der Herabregulation von Cathepsinen in Tumorzellen verantwortlich ist, konnte jedoch noch nicht geklärt werden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass der Effekt durch eine Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs vermittelt werden könnte (Malla et al., 2010; Zhang et al., 2014) oder durch die EGFR-vermittelte Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs (Chen et al., 2012). Huang et al. zeigten, dass Cathepsin den Abbau des „Epithelial growth factor receptors“ EGFR fördert, dessen Downstream-Signalwege über PI3K/AKT oder ERK1/2 vermittelt werden. Eine gemeinsame Inhibition von

Cathepsin S und EGFR in Krebszellen verstärkte die Apoptoserate (Huang et al., 2016). In unseren Experimenten war jedoch keine Veränderung der Phosphorylierung von AKT oder ERK nach Cathepsin-Knockdown festzustellen. Da es sich jedoch bei beiden um zentrale Signalwege handelt, die in Tumorzellen vermehrt aktiviert werden (De Luca et al., 2012), wäre es möglich, dass sich eine Veränderung durch Cathepsin-Downregulation aufgrund der starken basalen Aktivierung nicht in der Phosphorylierung der Downstream-Signalmoleküle abzeichnet. Häufig wird ebenfalls eine veränderte Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie nach Cathepsininhibition beschrieben, die für die Apoptoseinduktion eine Rolle spielt, wie es auch bei den Ergebnissen dieser Arbeit der Fall war. Nach Downregulation von uPAR und Cathepsin B in Gliomzellen war das pro-apoptotische Protein Bax verstärkt und das anti-apoptotische Protein Bcl-2 schwächer exprimiert, was einer reduzierten Bcl-2/Bax-Ratio entsprach (Malla et al., 2010). Der genaue Mechanismus involvierte zudem Calcineurin A, pro-apoptotisches BAD und anti-apoptotisches Bcl-xL (Malla et al., 2012). Auch in Gliomzellen, die mit Curcumin behandelt wurden, konnte ein Knockdown von Cathepsin L die Apoptose, die durch Curcumin mittels reduzierter Bcl-2/Bax-Ratio und Cytochrom-C-Freisetzung ausgelöst worden war, erhöhen (Fei et al., 2016). In murinen Brustdrüsenepithelzellen, die über mehrere Tage mit dem „Transforming growth factor“ TGF- β behandelt wurden und eine epithelial-mesenchymale Transition durchliefen, führte die Inhibition von Cathepsin B zu Apoptose, indem der Abbau des Tumorsuppressors Disabled-2, der das proapoptotische Protein Bim stabilisiert, gehemmt wurde (Jiang et al., 2016).

Es stellt sich weiterhin die Frage, weshalb Cathepsindefizienz nur bei Prostatakarzinomzellen Apoptose induziert, während sie bei Fibroblasten zu zellulärer Seneszenz führt. In der Literatur wurde bereits mehrfach festgestellt, dass in Zellen durch Inhibition von Cathepsinen Apoptose induziert wurde. Es handelte sich dabei jedoch stets um Tumorzellen (Akkari et al., 2016; Colella et al., 2010; Malla et al., 2010). Vicencio et al. beschreiben, dass der Zelltyp eine entscheidende Rolle dabei spielt, ob eine Zelle durch Stress in zelluläre Seneszenz oder Apoptose übergeht. So werden beschädigte Epithelzellen oder Fibroblasten vorwiegend seneszent, während Lymphozyten apoptotisch werden (Vicencio et al., 2008). Laut Erol können die Zellen, die zellulärem Stress ausgesetzt sind in drei Gruppen eingeteilt werden: bei Zellen in der proliferativen Phase und gleichzeitiger Aktivierung von Oncogenen wie beispielsweise cMyc wird durch p53 Apoptose ausgelöst; Zellen in der nicht-proliferativen Phase gehen bei geringem Stress-Level in Quieszenz – transienten Zellzyklusarrest – über, bei hohem Stress-Level in zelluläre Seneszenz – irreversiblen Zellzyklusarrest (Erol, 2011). Dies kann erklären, weshalb Cathepsin-

Defizienz in Fibroblasten Seneszenz induziert, während sie in Prostatakarzinomzellen zu einer gesteigerten Apoptose führt.

Der Zusammenhang zwischen Cathepsinen und Apoptose scheint jedoch einen dualen Charakter zu besitzen. Denn Cathepsine spielen gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der Auslösung des lysosomalen Zelltods (Gomez-Sintes et al., 2016; Reinheckel, 2013). Hierbei treten durch das Auslösen einer Permeabilisierung der Lysosomenmembran Cathepsine in das Zytosol der Zelle aus und führen daraufhin durch ihre proteolytische Aktivität den Zelltod herbei. Je nach Ausmaß der Lysosomenmembranruptur (LMP) kommt es zu unterschiedlichen Arten des Zelltodes: bei starker LMP wird Nekrose ausgelöst, bei begrenzter LMP wird der intrinsische Apoptoseweg induziert. Doch auch umgekehrt führt jeder Zelltod irgendwann zur LMP, welche das Absterben der Zelle in diesem Fall weiter beschleunigt (Aits and Jaattela, 2013). Nach LMP spalten Cathepsine das pro-apoptotische Protein Bid und aktivieren es dadurch, zudem bauen sie anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 ab und lösen dadurch Apoptose aus (Droga-Mazovec et al., 2008). So wurde die Apoptose von Blasenkarzinomzellen, die mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib behandelt wurden, durch die Aktivierung von Cathepsin B induziert (Amantini et al., 2015). Bei akuter Nierenverletzung verbesserte die Inhibition von Cathepsin D die Nierenfunktion und reduzierte die Apoptoserate (Cocchiario et al., 2016). Auf der anderen Seite stehen die oben genannten Forschungsergebnisse, die darstellen, dass der Verlust von Cathepsinen in Tumorzellen vermehrt Apoptose auslöst. Obwohl die Ergebnisse zunächst gegensätzlich erscheinen, schließt die Tatsache, dass Cathepsine über LMP den Zelltod (mit-)auslösen, nicht aus, dass die Downregulation von Cathepsinen in Tumorzellen Apoptose auslösen kann, da es sich hierbei um zwei unabhängige Mechanismen handelt. Die Downregulation oder Inhibition von Cathepsinen führt zwar zu einer verringerten Menge an aktiven Cathepsinen in den Lysosomen der Zelle; dies allein führt jedoch nicht zu einer reduzierten Apoptose, da für die Auslösung des lysosomalen Zelltodes der Membrandurchbruch die Voraussetzung ist (Droga-Mazovec et al., 2008). Die meisten Krebszellen weisen eine stärkere Expression von Cathepsinen auf und sezernieren diese vermehrt in den Extrazellularraum. Da sich in Umgebung eines Tumor häufig ein saures Milieu befindet (Hashim et al., 2011; Pilon-Thomas et al., 2016), können Cathepsine dort verstärkt aktiviert werden (van der Stappen et al., 1996). Deshalb wird angenommen, dass Cathepsine von extrazellulär die Apoptoseauslösung verhindern, indem sie in Signalwege eingreifen (Mohamed and Sloane, 2006; Palermo and Joyce, 2008). Eine andere Möglichkeit wäre, dass siRNA-induzierte Downregulation eines Cathepsins zu einer kompensatorischen Steigerung der Expression anderer Cysteinproteasen oder Cathepsine führt, welche

dann verstärkt lysosomalen Zelltod auslösen, indem sie die schützenden Proteine an der inneren Seite der Lysosomenmembran abbauen und es dadurch zu deren Ruptur kommt. Kompensatorische Mechanismen bei Cathepsinen wurden bereits häufig festgestellt (Akkari et al., 2016; Friedrichs et al., 2003; Sevenich et al., 2010). Eine interessante Entdeckung machten Jung et al.: sie fanden heraus, dass die Inhibition von Cathepsin B und L in β -Zellen des Pankreas die Autophagie limitierte und Caspase-abhängige Apoptose förderte. Die Inhibition der Cathepsine führte zur Akkumulation von Pro-Cathepsinen – Vorstufen der Cathepsine – in den Lysosomen, zu starker Vergrößerung der Lysosomen und zu lysosomaler Dysfunktion und resultierte in vermehrtem Zelltod (Jung et al., 2015).

Einige Autoren sind der Meinung, dass die Inhibition von Cathepsinen die Krebszellen vor dem Zelltod durch Chemotherapeutika schützen könnte, da Cathepsine für die LMP der Tumorzellen benötigt werden. Deshalb müsste bei der Entwicklung von Cathepsin-Inhibitoren zu therapeutischen Zwecken dies verhindert werden, z.B. durch eine Kombination des Inhibitors mit Nanopartikeln, die für eine Inhibition ausschließlich im Extrazellulärraum sorgen (Ruan et al., 2015). Zhang et al. stellten jedoch fest, dass der Knockdown von Cathepsin L in Paclitaxel-resistenten Ovarialkarzinomzellen eine erhöhte Paclitaxel-induzierte Apoptose auslöste, folglich die Krebszellen für das Chemotherapeutikum sensibilisierte (Zhang et al., 2016). Die Entdeckung, dass die Herabregulation von Cathepsinen zu einer erhöhten Apoptose in Prostatakarzinomzellen führt, ist sehr bedeutsam, und weitere Erforschung dieses Phänomens ist essenziell für eine sinnvolle therapeutische Anwendung in Zukunft.

E.5. Einfluss der Cathepsin-Defizienz auf den IGF-Signalweg

Die in Prostatakarzinomzellen überexprimierten Cathepsine üben eine Vielzahl von Funktionen aus, welche die Tumorentwicklung weiter begünstigen, wie Förderung von Proliferation, Invasion, Angiogenese und Verhinderung des apoptotischen Zelltods (Castino et al., 2002; Tan et al., 2013). Dies zeigt sich auch an den Ergebnissen dieser Arbeit, in denen festgestellt wurde, dass die Downregulation von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen zu einer gesteigerten Apoptoserate führte und die intrazelluläre Inhibition von Cathepsin B zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzellproliferation. Da vermutet wird, dass Cathepsine Einfluss auf Signalwege ausüben, um diese Wirkungen zu entfalten (Palermo and Joyce, 2008), stellte sich die Frage, an welchen Signalwegen sie beteiligt sind, um diese gegebenenfalls bei potenziellen Therapiemöglichkeiten auszunutzen. In dieser Arbeit wurde die Erforschung vor allem auf den Insulin-like-growthfactor (IGF) -Signalweg fokussiert, da das IGF-System in vielen Tumoren insbesondere dem Prostatakarzinom

hochreguliert ist (Arcaro, 2013; Bonilla et al., 2016; Roberts, 2004) und seine hauptsächlichen Wirkungen aus der Stimulation der Zellproliferation über den MAPK-Signalweg und der Hemmung der Apoptose und Förderung des Zellüberlebens über den AKT-Weg bestehen (Elumalai et al., 2014; Lima et al., 2009; Sun et al., 2016). Zudem wurden bereits Zusammenhänge zwischen dem IGF-Signalweg und Cathepsinen aufgezeigt (Kraus et al., 2012; Navab et al., 2008).

In dieser Arbeit war der Gesamt-IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) auf mRNA-Ebene vor allem in Cathepsin X und K-defizienten PC3-Zellen verstärkt exprimiert, während der IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR) auch nach Downregulation der Cathepsine B und L in PC3-Zellen hochreguliert war. Bei den LNCaP-Zellen jedoch zeigte sich keine Veränderung der Expression des IGF-IR und IGF-IIR auf mRNA-Ebene durch Cathepsin-Defizienz. Auf Proteinebene zeigte sich sowohl in den durch RNA-Interferenz Cathepsin X, B bzw. L-defizienten, als auch in den mit Cathepsininhibitoren behandelten Prostatakarzinomzellen eine Hochregulation des gesamten IGF-I-Rezeptors, mit Ausnahme der Prostatakarzinomzellen, in denen Cathepsin K herabreguliert worden war. Insgesamt zeigte sich jedoch ein großer Unterschied zwischen der Downregulation der Cathepsine auf mRNA-Ebene und der Inhibition auf Proteinebene: während in den Prostatakarzinomzellen mit Cathepsin-Knockdown die Proteinmenge des IGF-IR das 2-3 –fache der Kontrollzellen betrug, war der IGF-IR in den Proteaseinhibitor-behandelten Zellen durchschnittlich nur um ca. 10 – 30 % im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert. Die Phosphorylierung des IGF-IR war lediglich in den Cathepsin X, B und L-defizienten PC3-Zellen tendenziell leicht reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Da über den IGF-I-Rezeptor der PI3K/Akt-Signalweg, der zu einer Inhibition von Apoptose führt, und zudem der MAPK-Signalweg aktiviert wird, der die Proliferation der Zellen stimuliert und ebenfalls Apoptose inhibieren kann (Kong et al., 2016), liegt die Annahme nahe, dass der IGF-Signalweg für die beobachteten Ergebnisse in Cathepsin-defizienten Prostatakarzinomzellen verantwortlich sein könnte. Die Aktivierung des IGF-IR war in den Prostatakarzinomzellen mit siRNA-induzierter Downregulation von Cathepsinen leicht reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Doch bei der Phosphorylierung der Downstream-Moleküle Erk und Akt waren keine Unterschiede erkennbar. Das könnte jedoch auch daran liegen, dass es sehr viele Signalwege gibt, welche Erk und Akt beeinflussen (Lake et al., 2016; Mundi et al., 2016), weshalb Unterschiede in der Aktivierung bei diesen Proteinen nur sehr gering ausfallen können. Eine Forschungsgruppe fand heraus, dass murine H59 Lungenkarzinomzellen, in denen die Expression von Cathepsin L herabgesetzt war, eine reduzierte Aktivierung des IGF-IR bei Stimulation mit IGF-I stattfand. Außerdem war die Tumorzellapoptose in vivo gesteigert und Proliferation und Migration reduziert (Navab et al., 2008). Inhibition der Cathepsine B, L und D in Neuroblastomzellen veränderte nicht die

Aktivierung des IGF-IR, hemmte jedoch die Phosphorylierung von Downstream-Molekülen des MAPK-Signalwegs und führte zu verstärkter Apoptose (Soori et al., 2016).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie Cathepsine und der IGF-Signalweg kommunizieren können und es deshalb bei Defizienz der Proteasen zu verstärkter Apoptoseneigung der Prostatakarzinomzellen kommen könnte. Cathepsine bilden eine Gruppe der IGF-BP-Proteasen, welche die Bindeproteine der Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II degradieren (Abb. E.1).

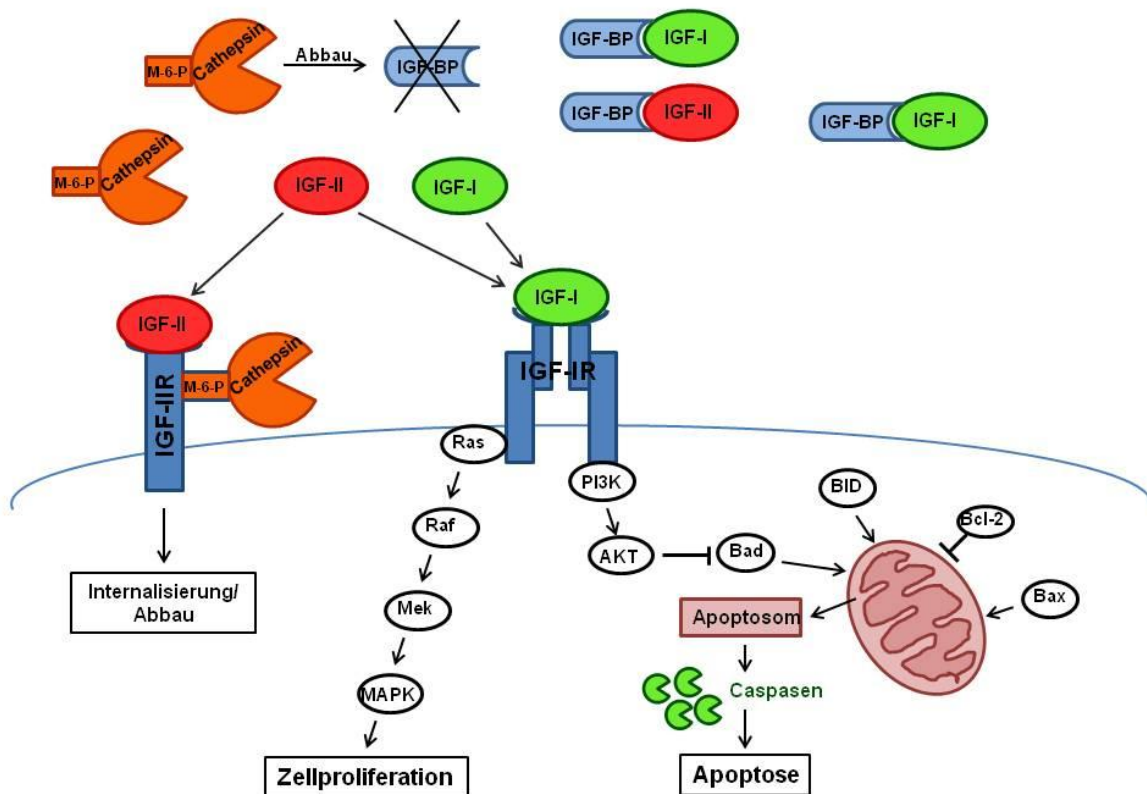


Abb. E.1: Interaktion von Cathepsinen mit dem IGF-Signalweg. IGF-I und IGF-II liegen zu 99% an IGF-BP gebunden vor. Cathepsine können IGF-BP abbauen. IGF-I und IGF-II können an den IGF-IR binden. Die Aktivierung des IGF-IR führt über den MAPK-Signalweg zu einer erhöhten Zellproliferation, über den PI3K/AKT-Signalweg zu einer Inhibition der Apoptose. IGF-II kann auch an den IGF-IIR/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor binden, ebenso wie Cathepsine mit ihrem Mannose-6-Phosphat-Rest. Das Binden an den IGF-IIR führt zur Internalisierung ins Lysosom und dem Abbau des Liganden.

So baut beispielsweise Cathepsin L die IGFBPs 3 und 4 in vitro ab (Zwad et al., 2002). Auf diese Weise wären bei Cathepsindefizienz mehr IGF-Bindeproteine vorhanden und die Wachstumsfaktoren schlechter für die Zellen verfügbar, weshalb die Prostatakarzinomzellen den IGF-IR auf der Zellmembran hochregulieren könnten,

um das geringere Angebot von IGF-I und -II zu kompensieren. Aufgrund der erhöhten Expression des IGF-IR ist dessen Aktivierung bei Cathepsin-defizienten Zellen deshalb nur geringfügig reduziert. Zudem ist das IGFBP 3 selbst - unabhängig von den IGFs - ein proapoptotisches Protein, das in PC3-Zellen Apoptose auslösen kann (Rajah et al., 1999). Eine erhöhte Aktivität von IGFBP 3 bei Defizienz der abbauenden Cathepsine könnte demnach ebenfalls zu einer gesteigerten Apoptose führen. Umgekehrt kann das IGFBP 4, welches ebenfalls über IGF-unabhängige anti-tumorigene Aktivität verfügt mit seinem C-terminalen Proteinfsegment CIBP-4 Cathepsin B inhibieren (Moreno et al., 2013).

Eine andere Erklärung besteht darin, dass durch die reduzierte Sekretion und Rückschleusung von Cathepsinen bei deren Downregulation in Prostatakarzinomzellen der dafür zuständige Mannose-6-Phosphat/IGF-II-Rezeptor (Edwards and Murphy, 1998) vermehrt IGF-II bindet und internalisiert (Abb. E.1). Auf diese Weise wird der IGF-IR weniger stark aktiviert und gegebenenfalls ebenfalls kompensatorisch hochreguliert. In Kaposi-Sarkom-Zellen, die durch den Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus KSHV aus endothelialen Zellen transformiert worden waren, induzierte KSHV die Expression des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors/IGF-IIRs. Dadurch nahm die Sekretion von Cathepsin B ab und gleichzeitig die intrazelluläre Retention und Aktivität von Cathepsin B zu, welche dann die Tumorzellprogression und -proliferation förderte (Rose et al., 2007). M6P/IGF-IIR-defiziente Leberzellen fetaler Ratten sezernierten übermäßig lysosomale Cathepsine und verfügten über verstärkte Fähigkeit zur Invasion (Puxbaum et al., 2012). Zudem gibt es noch weitere Mechanismen, wie Cathepsine mit dem IGF-System interagieren: In hepatozellulären Karzinomzellen förderte IGF-1 Wachstum und Metastasierung der Zellen, indem er den Abbau von Cathepsin B über das Ubiquitin-Proteasom-System hemmte und dadurch zu einer erhöhten Expression von Cathepsin B auf Proteinebene führte (Lei and Ling, 2015).

Es bleibt fraglich, warum die Downregulation von Cathepsin K nicht zu einer erhöhten Expression des Gesamt-IGF-IR auf Proteinebene geführt hat, jedoch in PC3-Zellen die gleiche Tendenz zu verstärkter Apoptose wie bei dem Knockdown der anderen Cathepsine. Cathepsin K ist funktionell hauptsächlich eine Kollagenase und in Prostatakarzinomzellen stärker exprimiert als in gesundem Prostatagewebe (Herroon et al., 2016). Es gibt bisher hauptsächlich Publikationen über die Rolle von Cathepsin K bei Invasion und Metastasierung von Tumoren (Verbovsek et al., 2015), über seinen Einfluss auf Signalwege oder Apoptose ist bisher noch wenig bekannt. Andrade et al. zeigten, dass Stimulation mit Cathepsin K die Aggregation von humanen Thrombozyten induzierte und zur Phosphorylierung des Signalmoleküls p38 MAPK führte (Andrade et al., 2016).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der IGF-Signalweg nur ein Teil eines komplexen Mechanismus ist, durch den der Knockdown von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen zu einer verstärkten Apoptose führt, und dass ein oder mehrere weitere Signalwege daran beteiligt sind. Neben dem IGF-Signalweg gibt es andere Signalwege, welche die Apoptosesteigerung bei Cathepsindefizienz vermitteln könnten. Andere Rezeptortyrosinkinasen und Integrinrezeptoren aktivieren – ähnlich dem IGF-IR – den MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg (Stupack and Cheresch, 2002). Procathepsin X beispielsweise kann durch sein RGD-Motiv mit Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ interagieren (Lechner et al., 2006); bei den anderen Cathepsinen liegt jedoch kein RGD-Motiv vor. Die Cathepsine B und L beeinflussen den Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR) – eine Rezeptortyrosinkinase – und auch den MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg (Pislar et al., 2014). In Glioblastomzellen wurde gezeigt, dass die Inhibition von Cathepsin S zu einer Induktion von mitochondrialer Apoptose und Autophagie durch die Hemmung des PI3K/AKT/mTOR/p70S6K-Signalwegs und die Aktivierung des JNK-Signalwegs führte (Zhang et al., 2014). Auch die Inhibition der Cathepsine B und L in β -Zellen des Pankreas führte zur Aktivierung von JNK und zu gesteigerter Apoptose (Jung et al., 2015). Die Aktivierung des Moleküls JNK ist wichtig für die Induktion von Apoptose (Xia et al., 1995). Cathepsin X interagiert im Zytosol von Magenkarzinomzellen mit dem ribosomalen Protein RPLP0, was zur Dysregulation von apoptotischen Signalwegen und zur Tumorzellprogression führt (Teller et al., 2015).

Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, dass die Downregulation von Cathepsinen den IGF-Signalweg beeinflusst und dadurch möglicherweise die beobachteten Effekte – die Reduktion der Tumorzellproliferation und Förderung der Apoptose – erzielt werden. Doch es ist nicht klar, ob die Ergebnisse komplett durch den IGF-Signalweg erklärt werden können, weshalb davon ausgegangen wird, dass noch weitere Signalwege – wie beispielsweise die oben genannten – an der Wirkweise der Cathepsin-Inhibition beteiligt sind.

F. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Entdeckung, dass die Hemmung bzw. Downregulation der Cathepsine X, B, L und K in Prostatakarzinomzellen eine verstärkte Apoptoserate bewirkt, ist von großer Bedeutung für die Tumorforschung. Denn die gängigen Therapeutika, die zur Behandlung von metastasiertem Prostatakrebs eingesetzt werden, sind beispielsweise Anti-Androgene, welche die für Prostatakrebszellen wichtigen Wachstumsfaktoren hemmen und durch den Androgen-Entzug zu Apoptose der Tumorzellen führen sollen. Doch bereits nach wenigen Jahren der Anwendung weisen viele Patienten eine Therapieresistenz auf (Marech et al., 2012). Deshalb ist es wichtig, zu erforschen, weshalb die Tumorzellen therapieresistent werden und wie in den Tumorzellen erneut Apoptose ausgelöst werden kann.

Bisher konnte noch nicht endgültig festgestellt werden, durch welche Signalwege die Downregulation von Cathepsinen mit verstärkter Apoptose zusammenhängt. Es gibt Hinweise darauf, dass der IGF-Signalweg an den Effekten der Cathepsin-Defizienz auf Prostatakarzinomzellen beteiligt ist, er kann sie jedoch nicht vollständig erklären. Andere mögliche Signalwege, die eine Rolle spielen könnten, wie beispielsweise Rezeptortyrosinkinasen, die ebenfalls zu einer Aktivierung des MAPK-Wegs und des PI3K/AKT-Wegs führen, sollten weiter erforscht werden. Zudem ist es nötig, die Rolle der einzelnen Cathepsine zu charakterisieren. In dieser Arbeit zeigte sich, dass der Knockdown jedes der Cathepsine X, B, L und K und auch die Verwendung jedes der Cysteinproteaseinhibitoren E-64d und CA-074-Me die Apoptoserate der Krebszellen tendenziell erhöhte. Jedoch spielten die Cathepsine X, B und L eine wichtigere Rolle bei der Beeinflussung des IGF-Signalwegs als Cathepsin K. Bei der Reduktion der Tumorzellproliferation spielte hauptsächlich die Inhibition des intrazellulären Cathepsin B eine Rolle. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich erneut weiterführende Fragen stellen, die in Zukunft untersucht werden sollten. Um – entsprechend der klinischen Anwendung – zu überprüfen, ob die Hemmung von Cathepsinen die Apoptoseauslösung durch Tumortherapeutika in Prostatakarzinomzellen verstärkt, könnten Apoptose-induzierende Substanzen oder gängige Tumortherapeutika mit und ohne Cathepsin-Inhibitoren getestet werden. Zudem wäre es äußerst interessant, wenn die gezeigten Ergebnisse in in vivo-Experimenten in ähnlicher Weise reproduziert werden könnten.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit sehr interessante Hinweise auf den Einfluss von Cathepsinen auf Proliferation, Apoptose und Signalwege in Prostatakarzinomzellen hervorgebracht haben, die in weiteren Experimenten genauer untersucht werden sollten, um Nutzen für Tumorthapien zu gewinnen.

G. Literaturverzeichnis

Aggarwal, N., and Sloane, B.F. (2014). Cathepsin B: multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl* 8, 427-437.

Aits, S., and Jaattela, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *Journal of cell science* 126, 1905-1912.

Akkari, L., Gocheva, V., Quick, M.L., Kester, J.C., Spencer, A.K., Garfall, A.L., Bowman, R.L., and Joyce, J.A. (2016). Combined deletion of cathepsin protease family members reveals compensatory mechanisms in cancer. *Genes & development* 30, 220-232.

Algaba, F., Trias, I., and Arce, Y. (2007). Natural history of prostatic carcinoma: the pathologist's perspective. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 175, 9-24.

Amantini, C., Morelli, M.B., Santoni, M., Soriani, A., Cardinali, C., Farfariello, V., Eleuteri, A.M., Bonfili, L., Mozzicafreddo, M., Nabissi, M., *et al.* (2015). Sorafenib induces cathepsin B-mediated apoptosis of bladder cancer cells by regulating the Akt/PTEN pathway. The Akt inhibitor, perifosine, enhances the sorafenib-induced cytotoxicity against bladder cancer cells. *Oncoscience* 2, 395-409.

Anderson, M.S., Gendrano, I.N., Liu, C., Jeffers, S., Mahon, C., Mehta, A., Mostoller, K., Zajic, S., Morris, D., Lee, J., *et al.* (2014). Odanacatib, a selective cathepsin K inhibitor, demonstrates comparable pharmacodynamics and pharmacokinetics in older men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 99, 552-560.

Andrade, S.S., Gouvea, I.E., Silva, M.C., Castro, E.D., de Paula, C.A., Okamoto, D., Oliveira, L., Peres, G.B., Ottaiano, T., Facina, G., *et al.* (2016). Cathepsin K induces platelet dysfunction and affects cell signaling in breast cancer - molecularly distinct behavior of cathepsin K in breast cancer. *BMC Cancer* 16, 173.

Arcaro, A. (2013). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Frontiers in pharmacology* 4, 30.

Aryankalayil, M.J., Makinde, A.Y., Gameiro, S.R., Hodge, J.W., Rivera-Solis, P.P., Palayoor, S.T., Ahmed, M.M., and Coleman, C.N. (2014). Defining Molecular Signature of Pro-Immunogenic Radiotherapy Targets in Human Prostate Cancer Cells. *Radiation research*.

Bach, L.A. (2015). Insulin-like growth factor binding proteins 4-6. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29, 713-722.

Bao, W., Fan, Q., Luo, X., Cheng, W.W., Wang, Y.D., Li, Z.N., Chen, X.L., and Wu, D. (2013). Silencing of Cathepsin B suppresses the proliferation and invasion of endometrial cancer. *Oncology reports* 30, 723-730.

Beausejour, C.M., and Campisi, J. (2006). Ageing: balancing regeneration and cancer. *Nature* 443, 404-405.

Bernards, R., and Weinberg, R.A. (2002). A progression puzzle. *Nature* 418, 823.

Bonilla, C., Lewis, S.J., Rowlands, M.A., Gaunt, T.R., Davey Smith, G., Gunnell, D., Palmer, T., Donovan, J.L., Hamdy, F.C., Neal, D.E., *et al.* (2016). Assessing the role of insulin-like growth factors and binding proteins in prostate cancer using Mendelian randomization:

Genetic variants as instruments for circulating levels. *International journal of cancer Journal international du cancer* 139, 1520-1533.

Brubaker, K.D., Vessella, R.L., True, L.D., Thomas, R., and Corey, E. (2003). Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18, 222-230.

Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology* 75, 685-705.

Campisi, J., Andersen, J.K., Kapahi, P., and Melov, S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Seminars in cancer biology* 21, 354-359.

Cartledge, D.M., Colella, R., Glazewski, L., Lu, G., and Mason, R.W. (2013). Inhibitors of cathepsins B and L induce autophagy and cell death in neuroblastoma cells. *Investigational new drugs* 31, 20-29.

Castino, R., Pace, D., Demoz, M., Gargiulo, M., Ariatta, C., Raiteri, E., and Isidoro, C. (2002). Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human neuroblastomas. *International journal of cancer Journal international du cancer* 97, 775-779.

Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., and Los, M.J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 61, 43-58.

Chen, K.L., Chang, W.S., Cheung, C.H., Lin, C.C., Huang, C.C., Yang, Y.N., Kuo, C.P., Kuo, C.C., Chang, Y.H., Liu, K.J., *et al.* (2012). Targeting cathepsin S induces tumor cell autophagy via the EGFR-ERK signaling pathway. *Cancer letters* 317, 89-98.

Chien, S.W., Kuo, D.Y., Liao, J.M., Wang, P.S., and Yu, C.H. (2016). Growth Modulation of Diabetic Factors and Antidiabetic Drugs on Prostate Cancer Cell Lines. *Chin J Physiol* 59, 109-118.

Cocchiari, P., Fox, C., Tregidgo, N.W., Howarth, R., Wood, K.M., Situmorang, G.R., Pavone, L.M., Sheerin, N.S., and Moles, A. (2016). Lysosomal protease cathepsin D; a new driver of apoptosis during acute kidney injury. *Sci Rep* 6, 27112.

Colella, R., Goodwyn, E., and Gopal, P. (2002). Increased cell density decreases cysteine proteinase inhibitor activity and increases invasive ability of two prostate tumor cell lines. *Cancer letters* 185, 163-172.

Colella, R., Jackson, T., and Goodwyn, E. (2004). Matrigel invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L+B activity. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 79, 121-127.

Colella, R., Lu, G., Glazewski, L., Korant, B., Matlapudi, A., England, M.R., Craft, C., Frantz, C.N., and Mason, R.W. (2010). Induction of cell death in neuroblastoma by inhibition of cathepsins B and L. *Cancer letters* 294, 195-203.

De Luca, A., Maiello, M.R., D'Alessio, A., Pergameno, M., and Normanno, N. (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets* 16 Suppl 2, S17-27.

DeClerck, Y.A., Mercurio, A.M., Stack, M.S., Chapman, H.A., Zutter, M.M., Muschel, R.J., Raz, A., Matrisian, L.M., Sloane, B.F., Noel, A., *et al.* (2004). Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *The American journal of pathology* 164, 1131-1139.

Denault, J.B., Eckelman, B.P., Shin, H., Pop, C., and Salvesen, G.S. (2007). Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-mediated inhibition of caspase 9. *The Biochemical journal* 405, 11-19.

Denault, J.B., and Salvesen, G.S. (2003). Expression, purification, and characterization of caspases. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]* Chapter 21, Unit 21 13.

Dennhofer, R., Kurschat, P., Zigrino, P., Klose, A., Bosserhoff, A., van Muijen, G., Krieg, T., Mauch, C., and Hunzelmann, N. (2003). Invasion of melanoma cells into dermal connective tissue in vitro: evidence for an important role of cysteine proteases. *International journal of cancer Journal international du cancer* 106, 316-323.

Diepenbruck, M., and Christofori, G. (2016). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol* 43, 7-13.

Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G.S., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *The Journal of biological chemistry* 283, 19140-19150.

Edwards, D.R., and Murphy, G. (1998). Cancer. Proteases--invasion and more. *Nature* 394, 527-528.

Elumalai, P., Arunkumar, R., Benson, C.S., Sharmila, G., and Arunakaran, J. (2014). Nimbolide inhibits IGF-I-mediated PI3K/Akt and MAPK signalling in human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). *Cell Biochem Funct* 32, 476-484.

Erol, A. (2011). Deciphering the intricate regulatory mechanisms for the cellular choice between cell repair, apoptosis or senescence in response to damaging signals. *Cell Signal* 23, 1076-1081.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* 4, 330-349.

Fei, Y., Xiong, Y., Zhao, Y., Wang, W., Han, M., Wang, L., Tan, C., and Liang, Z. (2016). Cathepsin L knockdown enhances curcumin-mediated inhibition of growth, migration, and invasion of glioma cells. *Brain Res* 1646, 580-588.

Fesler, A., Zhang, N., and Ju, J. (2016). The expanding regulatory universe of p53 in gastrointestinal cancer. *F1000Res* 5, 756.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Friedrichs, B., Tepel, C., Reinheckel, T., Deussing, J., von Figura, K., Herzog, V., Peters, C., Saftig, P., and Brix, K. (2003). Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *The Journal of clinical investigation* 111, 1733-1745.

Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J.A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes & development* 20, 543-556.

Gogineni, V.R., Gupta, R., Nalla, A.K., Velpula, K.K., and Rao, J.S. (2012). uPAR and cathepsin B shRNA impedes TGF-beta1-driven proliferation and invasion of meningioma cells in a XIAP-dependent pathway. *Cell death & disease* 3, e439.

Gomez-Sintes, R., Ledesma, M.D., and Boya, P. (2016). Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing research reviews*.

Gondi, C.S., and Rao, J.S. (2013). Cathepsin B as a cancer target. *Expert opinion on therapeutic targets* 17, 281-291.

Goo, Y.A., Liu, A.Y., Ryu, S., Shaffer, S.A., Malmstrom, L., Page, L., Nguyen, L.T., Doneanu, C.E., and Goodlett, D.R. (2009). Identification of secreted glycoproteins of human prostate and bladder stromal cells by comparative quantitative proteomics. *The Prostate* 69, 49-61.

Gusscott, S., Jenkins, C.E., Lam, S.H., Giambra, V., Pollak, M., and Weng, A.P. (2016). IGF1R Derived PI3K/AKT Signaling Maintains Growth in a Subset of Human T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemias. *PloS one* 11, e0161158.

Hasanbasic, S., Jahic, A., Karahmet, E., Sejranic, A., and Prnjavorac, B. (2016). The Role of Cysteine Protease in Alzheimer Disease. *Mater Sociomed* 28, 235-238.

Hashim, A.I., Zhang, X., Wojtkowiak, J.W., Martinez, G.V., and Gillies, R.J. (2011). Imaging pH and metastasis. *NMR Biomed* 24, 582-591.

Hasty, P., and Christy, B.A. (2013). p53 as an intervention target for cancer and aging. *Pathobiology of aging & age related diseases* 3.

Herroon, M.K., Sharma, R., Rajagurubandara, E., Turro, C., Kodanko, J.J., and Podgorski, I. (2016). Photoactivated inhibition of cathepsin K in a 3D tumor model. *Biological chemistry* 397, 571-582.

Huang, C.C., Lee, C.C., Lin, H.H., and Chang, J.Y. (2016). Cathepsin S attenuates endosomal EGFR signalling: A mechanical rationale for the combination of cathepsin S and EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Sci Rep* 6, 29256.

Ibrahim, S.A., El-Ghonaimy, E.A., Hassan, H., Mahana, N., Mahmoud, M.A., El-Mamlouk, T., El-Shinawi, M., and Mohamed, M.M. (2016). Hormonal-receptor positive breast cancer: IL-6 augments invasion and lymph node metastasis via stimulating cathepsin B expression. *J Adv Res* 7, 661-670.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews Cancer* 2, 277-288.

Iwamura, M., Sluss, P.M., Casamento, J.B., and Cockett, A.T. (1993). Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines. *The Prostate* 22, 243-252.

Jeong, M.H., Ko, H., Jeon, H., Sung, G.J., Park, S.Y., Jun, W.J., Lee, Y.H., Lee, J., Lee, S.W., Yoon, H.G., *et al.* (2016). Delphinidin induces apoptosis via cleaved HDAC3-mediated p53 acetylation and oligomerization in prostate cancer cells. *Oncotarget*.

- Jiang, Y., Woosley, A.N., Sivalingam, N., Natarajan, S., and Howe, P.H. (2016). Cathepsin-B-mediated cleavage of Disabled-2 regulates TGF-beta-induced autophagy. *Nat Cell Biol* 18, 851-863.
- Joyce, J.A., Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraudo, E., Tsai, F.Y., Greenbaum, D.C., Hager, J.H., Bogoy, M., and Hanahan, D. (2004). Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer cell* 5, 443-453.
- Joyce, J.A., and Hanahan, D. (2004). Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell cycle* 3, 1516-1619.
- Jung, M., Lee, J., Seo, H.Y., Lim, J.S., and Kim, E.K. (2015). Cathepsin inhibition-induced lysosomal dysfunction enhances pancreatic beta-cell apoptosis in high glucose. *PloS one* 10, e0116972.
- Kang, M.H., and Reynolds, C.P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 1126-1132.
- Kawata, H., Kamiakito, T., Nakaya, T., Komatsubara, M., Komatsu, K., Morita, T., Nagao, Y., and Tanaka, A. (2016). Stimulation of cellular senescent processes, including secretory phenotypes and anti-oxidant responses, after androgen deprivation therapy in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Kenig, S., Frangez, R., Pucer, A., and Lah, T. (2011). Inhibition of cathepsin L lowers the apoptotic threshold of glioblastoma cells by up-regulating p53 and transcription of caspases 3 and 7. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 16, 671-682.
- Kim, V.N. (2003). RNA interference in functional genomics and medicine. *Journal of Korean medical science* 18, 309-318.
- Kimura, G., Kasuya, J., Giannini, S., Honda, Y., Mohan, S., Kawachi, M., Akimoto, M., and Fujita-Yamaguchi, Y. (1996). Insulin-like growth factor (IGF) system components in human prostatic cancer cell-lines: LNCaP, DU145, and PC-3 cells. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 3, 39-46.
- Kirby, R. (2016). The role of PSA in detection and management of prostate cancer. *Practitioner* 260, 17-21, 13.
- Kondo, M., Yamato, M., Takagi, R., Namiki, H., and Okano, T. (2015). Membrane-Permeable Calpain Inhibitors Promote Rat Oral Mucosal Epithelial Cell Proliferation by Inhibiting IL-1alpha Signaling. *PloS one* 10, e0134240.
- Kong, D., Gong, L., Arnold, E., Shanmugam, S., Fort, P.E., Gardner, T.W., and Abcouwer, S.F. (2016). Insulin-like growth factor 1 rescues R28 retinal neurons from apoptotic death through ERK-mediated BimEL phosphorylation independent of Akt. *Exp Eye Res*.
- Kos, J., Vizin, T., Fonovic, U.P., and Pislari, A. (2014). Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Seminars in cancer biology*.
- Kraus, S., Bunsen, T., Schuster, S., Cichon, M.A., Tacke, M., Reinheckel, T., Sommerhoff, C.P., Jochum, M., and Nagler, D.K. (2011). Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *European journal of cell biology* 90, 678-686.

- Kraus, S.e.a., Kraus, S., Fruth, M., Bunsen, T., and Nagler, D.K. (2012). IGF-I receptor phosphorylation is impaired in cathepsin X-deficient prostate cancer cells. *Biological chemistry* 393, 1457-1462.
- Lake, D., Correa, S.A., and Muller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci*.
- Lankelma, J.M., Voorend, D.M., Barwari, T., Koetsveld, J., Van der Spek, A.H., De Porto, A.P.N.A., Van Rooijen, G., and Van Noorden, C.J.F. (2010). Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci* 86, 225-233.
- Lechner, A.M., Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochum, M., and Nagler, D.K. (2006). RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin α v β 3 mediates cell-adhesive properties. *The Journal of biological chemistry* 281, 39588-39597.
- Lei, T., and Ling, X. (2015). IGF-1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via the inhibition of proteasome-mediated cathepsin B degradation. *World J Gastroenterol* 21, 10137-10149.
- Leto, G., Sepporta, M.V., Crescimanno, M., Flandina, C., and Tumminello, F.M. (2010). Cathepsin L in metastatic bone disease: therapeutic implications. *Biological chemistry* 391, 655-664.
- Li, G., and Iyengar, R. (2002). Calpain as an effector of the Gq signaling pathway for inhibition of Wnt/ β -catenin-regulated cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13254-13259.
- Lima, G.A., Correa, L.L., Gabrich, R., Miranda, L.C., and Gadelha, M.R. (2009). IGF-I, insulin and prostate cancer. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 53, 969-975.
- Lu, W., Tinsley, H.N., Keeton, A., Qu, Z., Piazza, G.A., and Li, Y. (2009). Suppression of Wnt/ β -catenin signaling inhibits prostate cancer cell proliferation. *European journal of pharmacology* 602, 8-14.
- Lujambio, A. (2016). To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *Bioessays* 38 Suppl 1, S56-64.
- Malla, R., Gopinath, S., Alapati, K., Gondi, C.S., Gujrati, M., Dinh, D.H., Mohanam, S., and Rao, J.S. (2010). Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas. *PloS one* 5, e13731.
- Malla, R.R., Gopinath, S., Gondi, C.S., Alapati, K., Dinh, D.H., Tsung, A.J., and Rao, J.S. (2012). uPAR and cathepsin B downregulation induces apoptosis by targeting calcineurin A to BAD via Bcl-2 in glioma. *Journal of neuro-oncology* 107, 69-80.
- Marech, I., Vacca, A., Ranieri, G., Gnani, A., and Dammacco, F. (2012). Novel strategies in the treatment of castration-resistant prostate cancer (Review). *International journal of oncology* 40, 1313-1320.
- Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 764-775.
- Montaser, M., Lalmanach, G., and Mach, L. (2002). CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biological chemistry* 383, 1305-1308.

- Moreno, M.J., Ball, M., Rukhlova, M., Slinn, J., L'Abbe, D., Iqbal, U., Monette, R., Hagedorn, M., O'Connor-McCourt, M.D., Durocher, Y., *et al.* (2013). IGFBP-4 anti-angiogenic and anti-tumorigenic effects are associated with anti-cathepsin B activity. *Neoplasia* 15, 554-567.
- Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., Corti, A., Signorini, C., and Maellaro, E. (2015). Calpain-3 impairs cell proliferation and stimulates oxidative stress-mediated cell death in melanoma cells. *PloS one* 10, e0117258.
- Moschos, S.J., and Mantzoros, C.S. (2002). The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 63, 317-332.
- Mundi, P.S., Sachdev, J., McCourt, C., and Kalinsky, K. (2016). AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *Br J Clin Pharmacol*.
- Munoz-Moreno, L., Arenas, M.I., Carmena, M.J., Schally, A.V., Sanchez-Chapado, M., Prieto, J.C., and Bajo, A.M. (2016). Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of GHRH antagonists in prostate cancer. *Oncotarget*.
- Murray, E.J., Grisanti, M.S., Bentley, G.V., and Murray, S.S. (1997). E64d, a membrane-permeable cysteine protease inhibitor, attenuates the effects of parathyroid hormone on osteoblasts in vitro. *Metabolism: clinical and experimental* 46, 1090-1094.
- Nagler, D.K., Kruger, S., Kellner, A., Ziomek, E., Menard, R., Buhtz, P., Krams, M., Roessner, A., and Kellner, U. (2004). Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *The Prostate* 60, 109-119.
- Nalla, A.K., Gorantla, B., Gondi, C.S., Lakka, S.S., and Rao, J.S. (2010). Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer gene therapy* 17, 599-613.
- Navab, R., Pedraza, C., Fallavollita, L., Wang, N., Chevet, E., Auguste, P., Jenna, S., You, Z., Bikfalvi, A., Hu, J., *et al.* (2008). Loss of responsiveness to IGF-I in cells with reduced cathepsin L expression levels. *Oncogene* 27, 4973-4985.
- Obermajer, N., Jevnikar, Z., Doljak, B., and Kos, J. (2008). Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connective tissue research* 49, 193-196.
- Oliveira, C.S., Pereira, H., Alves, S., Castro, L., Baltazar, F., Chaves, S.R., Preto, A., and Corte-Real, M. (2015). Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria. *Cell death & disease* 6, e1788.
- Palermo, C., and Joyce, J.A. (2008). Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends in pharmacological sciences* 29, 22-28.
- Papachristou, D.J., Basdra, E.K., and Papavassiliou, A.G. (2012). Bone metastases: molecular mechanisms and novel therapeutic interventions. *Medicinal research reviews* 32, 611-636.
- Pawlikowski, J.S., Adams, P.D., and Nelson, D.M. (2013). Senescence at a glance. *Journal of cell science* 126, 4061-4067.
- Payne, C.D., Deeg, M.A., Chan, M., Tan, L.H., LaBell, E.S., Shen, T., and DeBrot, D.J. (2014). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cathepsin S inhibitor, LY3000328, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 78, 1334-1342.

Pernicova, Z., Slabakova, E., Kharashvili, G., Bouchal, J., Kral, M., Kunicka, Z., Machala, M., Kozubik, A., and Soucek, K. (2011). Androgen depletion induces senescence in prostate cancer cells through down-regulation of Skp2. *Neoplasia* 13, 526-536.

Pilon-Thomas, S., Kodumudi, K.N., El-Kenawi, A.E., Russell, S., Weber, A.M., Luddy, K., Damaghi, M., Wojtkowiak, J.W., Mule, J.J., Ibrahim-Hashim, A., *et al.* (2016). Neutralization of Tumor Acidity Improves Antitumor Responses to Immunotherapy. *Cancer research* 76, 1381-1390.

Pislar, A.H., Zidar, N., Kikelj, D., and Kos, J. (2014). Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology* 82, 121-131.

Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M., and Ohtsuki, M. (2016). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 17.

Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Sameni, M., Jedeszko, C., Bhagat, S., Cher, M.L., and Sloane, B.F. (2005). Bone microenvironment modulates expression and activity of cathepsin B in prostate cancer. *Neoplasia* 7, 207-223.

Podgorski, I., Linebaugh, B.E., and Sloane, B.F. (2007). Cathepsin K in the bone microenvironment: link between obesity and prostate cancer? *Biochemical Society transactions* 35, 701-703.

Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature reviews Cancer* 8, 915-928.

Premzl, A., Turk, V., and Kos, J. (2006). Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 97, 1230-1240.

Pulz, L.H., and Strefezzi, R.F. (2016). Proteases as prognostic markers in human and canine cancers. *Vet Comp Oncol*.

Puxbaum, V., Nimmerfall, E., Bauerl, C., Taub, N., Blaas, P.M., Wieser, J., Mikula, M., Mikulits, W., Ng, K.M., Yeoh, G.C., *et al.* (2012). M6P/IGF2R modulates the invasiveness of liver cells via its capacity to bind mannose 6-phosphate residues. *J Hepatol* 57, 337-343.

Qin, G., Cai, Y., Long, J., Zeng, H., Xu, W., Li, Y., Liu, M., Zhang, H., He, Z.L., and Chen, W.G. (2016). Cathepsin L is involved in proliferation and invasion of breast cancer cells. *Neoplasia* 63, 30-36.

Rajah, R., Khare, A., Lee, P.D., and Cohen, P. (1999). Insulin-like growth factor-binding protein-3 is partially responsible for high-serum-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *The Journal of endocrinology* 163, 487-494.

Rajah, T., and Chow, S.C. (2015). Suppression of Human T Cell Proliferation Mediated by the Cathepsin B Inhibitor, z-FA-FMK Is Due to Oxidative Stress. *PloS one* 10, e0123711.

Reinheckel, T. (2013). On the road to inflammation: linking lysosome disruption, lysosomal protease release and necrotic death of immune cells. *Cell cycle* 12, 1994.

Reiser, J., Adair, B., and Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 120, 3421-3431.

Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica et biophysica acta* 1824, 22-33.

Roberts, C.T., Jr. (2004). IGF-1 and prostate cancer. *Novartis Foundation symposium* 262, 193-199; discussion 199-204, 265-198.

Rose, P.P., Bogyo, M., Moses, A.V., and Fruh, K. (2007). Insulin-like growth factor II receptor-mediated intracellular retention of cathepsin B is essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 81, 8050-8062.

Ruan, H., Hao, S., Young, P., and Zhang, H. (2015). Targeting Cathepsin B for Cancer Therapies. *Horiz Cancer Res* 56, 23-40.

Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., and Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 32, 5129-5143.

Saab, R. (2011). Senescence and pre-malignancy: how do tumors progress? *Seminars in cancer biology* 21, 385-391.

Sato, A., Omi, T., Yamamoto, A., Satake, A., Hiramoto, A., Masutani, M., Tanuma, S., Wataya, Y., and Kim, H.S. (2016). MicroRNA-351 Regulates Two-Types of Cell Death, Necrosis and Apoptosis, Induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *PloS one* 11, e0153130.

Sevenich, L., Schurigt, U., Sachse, K., Gajda, M., Werner, F., Muller, S., Vasiljeva, O., Schwinde, A., Klemm, N., Deussing, J., *et al.* (2010). Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2497-2502.

Shan, W., Yang, G., and Liu, J. (2009). The inflammatory network: bridging senescent stroma and epithelial tumorigenesis. *Frontiers in bioscience* 14, 4044-4057.

Sigloch, F.C., Knopf, J.D., Weisser, J., Gomez-Auli, A., Biniossek, M.L., Petrera, A., and Schilling, O. (2016). Proteomic analysis of silenced cathepsin B expression suggests non-proteolytic cathepsin B functionality. *Biochimica et biophysica acta*.

Siklos, M., BenAissa, M., and Thatcher, G.R. (2015). Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin B* 5, 506-519.

Sivaraman, J., Nagler, D.K., Zhang, R., Menard, R., and Cygler, M. (2000). Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *Journal of molecular biology* 295, 939-951.

Small, D.M., Burden, R.E., Jaworski, J., Hegarty, S.M., Spence, S., Burrows, J.F., McFarlane, C., Kissenpfennig, A., McCarthy, H.O., Johnston, J.A., *et al.* (2013). Cathepsin S from both tumor and tumor-associated cells promote cancer growth and neovascularization. *International journal of cancer Journal international du cancer* 133, 2102-2112.

Soori, M., Lu, G., and Mason, R.W. (2016). Cathepsin Inhibition Prevents Autophagic Protein Turnover and Downregulates Insulin Growth Factor-1 Receptor-Mediated Signaling in Neuroblastoma. *J Pharmacol Exp Ther* 356, 375-386.

Stupack, D.G., and Cheresch, D.A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of cell science* 115, 3729-3738.

- Su, S., Zhu, X., Lin, L., Chen, X., Wang, Y., Zi, J., Dong, Y., Xie, Y., Zhu, Y., Zhang, J., *et al.* (2015). Lowering endogenous cathepsin D abundance results in ROS accumulation and cell senescence. *Mol Cell Proteomics*.
- Sudhan, D.R., Pampo, C., Rice, L., and Siemann, D.W. (2016). Cathepsin L inactivation leads to multimodal inhibition of prostate cancer cell dissemination in a preclinical bone metastasis model. *International journal of cancer Journal international du cancer* 138, 2665-2677.
- Sudhan, D.R., and Siemann, D.W. (2013). Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 30, 891-902.
- Sudhan, D.R., and Siemann, D.W. (2015). Cathepsin L targeting in cancer treatment. *Pharmacol Ther* 155, 105-116.
- Sun, X., Li, J., Sun, Y., Zhang, Y., Dong, L., Shen, C., Yang, L., Yang, M., Li, Y., Shen, G., *et al.* (2016). miR-7 reverses the resistance to BRAFi in melanoma by targeting EGFR/IGF-1R/CRAF and inhibiting the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Oncotarget*.
- Szpaderska, A.M., and Frankfater, A. (2001). An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer research* 61, 3493-3500.
- Tan, G.J., Peng, Z.K., Lu, J.P., and Tang, F.Q. (2013). Cathepsins mediate tumor metastasis. *World journal of biological chemistry* 4, 91-101.
- Teller, A., Jechorek, D., Hartig, R., Adolf, D., Reissig, K., Roessner, A., and Franke, S. (2015). Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer. *Pathol Res Pract* 211, 62-70.
- Tong, B., Wan, B., Wei, Z., Wang, T., Zhao, P., Dou, Y., Lv, Z., Xia, Y., and Dai, Y. (2014). Role of cathepsin B in regulating migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes into inflamed tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 177, 586-597.
- van der Stappen, J.W., Williams, A.C., Maciewicz, R.A., and Paraskeva, C. (1996). Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *International journal of cancer Journal international du cancer* 67, 547-554.
- Verbovsek, U., Van Noorden, C.J., and Lah, T.T. (2015). Complexity of cancer protease biology: Cathepsin K expression and function in cancer progression. *Seminars in cancer biology* 35, 71-84.
- Vicencio, J.M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., Morselli, E., Ben Younes, A., Maiuri, M.C., Lavandro, S., *et al.* (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 54, 92-99.
- Wadosky, K.M., and Koochekpour, S. (2016). Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Oncotarget*.
- Wang, J., Chen, L., Li, Y., and Guan, X.Y. (2011). Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PloS one* 6, e24967.

- Wang, W., Long, L., Wang, L., Tan, C., Fei, X., Chen, L., Huang, Q., and Liang, Z. (2016). Knockdown of Cathepsin L promotes radiosensitivity of glioma stem cells both in vivo and in vitro. *Cancer letters* 371, 274-284.
- Wang, X., Xiong, L., Yu, G., Li, D., Peng, T., Luo, D., and Xu, J. (2015). Cathepsin S silencing induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Am J Transl Res* 7, 100-110.
- Wang, Y., and Tjandra, N. (2013). Structural insights of tBid, the caspase-8 activated Bid, and its BH3 domain. *The Journal of biological chemistry*.
- Weidle, U.H., Birzele, F., Kollmorgen, G., and Ruger, R. (2016). Molecular Mechanisms of Bone Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 13, 1-12.
- Withana, N.P., Blum, G., Sameni, M., Slaney, C., Anbalagan, A., Olive, M.B., Bidwell, B.N., Edgington, L., Wang, L., Moin, K., *et al.* (2012). Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer. *Cancer research* 72, 1199-1209.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., and Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Xu, B., Tang, G., Xiao, C., Wang, L., Yang, Q., and Sun, Y. (2014). Androgen deprivation therapy induces androgen receptor-dependent upregulation of Egr1 in prostate cancers. *International journal of clinical and experimental pathology* 7, 2883-2893.
- Yakar, S., Courtland, H.W., and Clemmons, D. (2010). IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 2543-2552.
- Yan, J.A., Xiao, H., Ji, H.X., Shen, W.H., Zhou, Z.S., Song, B., Chen, Z.W., and Li, W.B. (2010). Cathepsin L is associated with proliferation and clinical outcome of urothelial carcinoma of the bladder. *The Journal of international medical research* 38, 1913-1922.
- Zajic, S., Rossenu, S., Hreniuk, D., Kesisoglou, F., McCrea, J., Liu, F., Sun, L., Witter, R., Gauthier, D., Helmy, R., *et al.* (2016). The Absolute Bioavailability and Effect of Food on the Pharmacokinetics of Odanacatib: A Stable-Label i.v./Oral Study in Healthy Postmenopausal Women. *Drug Metab Dispos* 44, 1450-1458.
- Zhang, H., Zhang, L., Wei, L., Gao, X., Tang, L.I., Gong, W., Min, N.A., Zhang, L.I., and Yuan, Y. (2016). Knockdown of cathepsin L sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy. *Oncol Lett* 11, 4235-4239.
- Zhang, L., Smith, D.W., Gardiner, B.S., and Grodzinsky, A.J. (2013). Modeling the Insulin-Like Growth Factor System in Articular Cartilage. *PloS one* 8, e66870.
- Zhang, L., Wang, H., Xu, J., Zhu, J., and Ding, K. (2014). Inhibition of cathepsin S induces autophagy and apoptosis in human glioblastoma cell lines through ROS-mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and JNK signaling pathways. *Toxicology letters*.
- Zhang, Q.Q., Wang, W.J., Li, J., Yang, N., Chen, G., Wang, Z., and Liang, Z.Q. (2015). Cathepsin L suppression increases the radiosensitivity of human glioma U251 cells via G2/M cell cycle arrest and DNA damage. *Acta Pharmacol Sin* 36, 1113-1125.
- Zielinski, R.R., Eigl, B.J., and Chi, K.N. (2013). Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *Cancer journal* 19, 79-89.

Zwad, O., Kubler, B., Roth, W., Scharf, J.G., Saftig, P., Peters, C., and Bräulke, T. (2002). Decreased intracellular degradation of insulin-like growth factor binding protein-3 in cathepsin L-deficient fibroblasts. *FEBS letters* 510, 211-215.

H. Danksagung

Zu der Entstehung dieser Arbeit haben viele Personen direkt oder indirekt beigetragen, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Leiter des Lehrstuhles für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Institutes und Leiter des Promotionsstudienganges „Molekulare Medizin“, sowie seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. T. Gudermann aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, für die Möglichkeit, im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ wissenschaftlich tätig sein zu dürfen.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dorit Nägler, die mich in alle Experimente eingearbeitet hat, mich während meiner experimentellen Arbeit und dem Schreiben der Promotionsarbeit stets begleitet und motiviert hat, für ihre Ratschläge und Korrekturen bei der Erstellung der Dissertation, ihre immer geduldigen und aufbauenden Worte und ihre großartige persönliche Unterstützung.

Heidrun Grondiger, die mich mit ihrer medizinisch-technischen Erfahrung bei den Experimenten stets tatkräftig unterstützt hat.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden, Post-Docs und Arbeitsgruppenleitern des Labors „ExperiMed“ für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die fröhliche Atmosphäre.

Meinen Geschwistern und Freunden für ihre Motivation, ihre guten Ratschläge und gemeinsame Aktivitäten außerhalb des Studiums.

Meinen Eltern Werner und Christine Dyckhoff, die ihre Begeisterung für Naturwissenschaften schon früh mit mir geteilt haben, für ihre stete Unterstützung, Förderung meines beruflichen Werdegangs und Ermutigung zur wissenschaftlichen Forschung.

Meinem Freund Tengyi, dessen aufbauenden Worte und Ermutigungen besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

I. Eidesstattliche Versicherung

Dyckhoff, Susanne

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss lysosomaler Cysteinproteasen auf proliferative Signalwege und Apoptosemechanismen in Prostatakarzinomzellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin